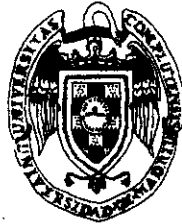
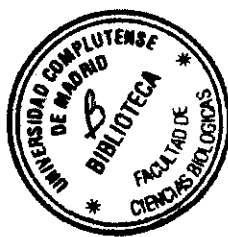


T 578.822.44
5711
at

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
Dpto. de FISILOGIA ANIMAL



**ESTUDIO DE LA INFECCION POR EL VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO (HPV) EN BIOPSIAS DEL TRACTO GENITAL
FEMENINO INFERIOR MEDIANTE TECNICAS DE
INMUNOHISTOQUIMICA E HIBRIDACION IN SITU**



FERNANDO GOMEZ AGUADO

Madrid, 1994

R- 22.126

Vº Bº EL DIRECTOR

ANTONIO LOPEZ BRAVO

FERNANDO GOMEZ

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, y de forma especial, a mi director de tesis, el Dr. Antonio López Bravo, Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del C.I.C., por la confianza que ha depositado en mí, su dedicación y por poner a mi disposición su excelente biblioteca personal.

A la Dra. Ma José Alonso, Jefa de Sección del mismo Servicio, por su ilusión, el gran apoyo prestado y su incansable tesón.

Al Dr. Agustín Bullón, Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, por permitirme el acceso a su archivo y a los Dres. José I. Paz, Ma. Mar Abad, Elisa Muñoz y Ma Luisa Nájera por las facilidades y la ayuda prestada en la revisión del mencionado archivo.

Al Dr. F. Cermeno, por las piezas del archivo de Anatomía Patológica del Hospital Nuestra Señora de Sonsoles de Avila.

A los Dres. Noemi Romero, ginecóloga del Centro Penitenciario Femenino de Madrid, Ma Jesús Cancelo, ginecóloga del Centro de Orientación Familiar de Guadalajara y J. Campillo, ginecólogo del Ayuntamiento de Madrid, por su desinteresada colaboración en la obtención de nuevas muestras.

A mis compañeros y amigos del Servicio de Anatomía Patológica del C.I.C., Ana Picazo, Ma. Teresa Corcuera y Manuel Roldán, por su gran ayuda y continuo aliento; a todo el personal del laboratorio general de técnicas histológicas, en especial a Angel Blanco y Marina Capa, por la realización de los cortes y técnicas de rutina; y a Isabel Curiel, becaria del servicio, por su inestimable ayuda.

Al Dr. Ricardo Martínez, modelo de constancia científica, por su continuo

apoyo.

Quisiera también agradecer de forma especial al Dr. José Sanz Tobes las facilidades dadas y su continuo aliento.

Finalmente, a mi mujer, por la gran paciencia demostrada, el cariño derrochado y su eterna comprensión, y a mi hijo, que espero sepa perdonarme el tiempo que no he pasado con él.

*A Lucía, mi mujer,
a Javier, mi hijo,
y a mis padres.*

ABREVIATURAS

A	: Adenina.
ABC	: Complejo avidina-biotina.
ADN	: Acido desoxirribonucleico.
AEC	: Amino-etil-carbazol.
APAAP	: Fosfatasa alcalina-anti-fosfatasa alcalina.
ARN	: Acido ribonucleico.
ATCC	: American Type Culture Collection.
BBS	: Tampón borato salino.
BCIP	: Bromo-cloro-indol-fosfato.
BPV	: Virus del papiloma bovino.
BSA	: Albúmina bovina.
C	: Citosina.
CIN	: Neoplasia intraepitelial cervical.
CIN I	: Neoplasia intraepitelial cervical grado I.
CIN II	: Neoplasia intraepitelial cervical grado II.
CIN III	: Neoplasia intraepitelial cervical grado III.
CIS	: Carcinoma <i>in situ</i> .
COF	: Centro de orientación familiar.
CPF	: Centro Penitenciario Femenino.
DAB	: Diaminobencidina.
DMF	: Dimetilformamida.
DMSO	: Dimetilsulfóxido.
DPV	: Virus del papiloma del ciervo.
EDTA	: Etilen-diamino-tetra-acético.
G	: Guanina.
HE	: Hematoxilina-eosina.
HIS	: Hibridación <i>in situ</i> .
HPV	: Virus del papiloma humano.
HSIL	: Lesión intraepitelial escamosa de alto grado.
IHQ	: Inmunohistoquímica.
LCR	: Región control larga.
LSIL	: Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado.
NBT	: Azul de nitrotetrazolio.
NCR	: Región no codificante.

OR : Razón de ventaja.
ORF : Pauta de lectura abierta.
PAP : Peroxidasa-anti-peroxidasa.
PBS : Tampón fosfato salino.
PCR : Reacción en cadena de la polimerasa.
PV : Virus del papiloma.
RR : Riesgo relativo.
SDS : Dodecil sulfato sódico.
SIL : Lesión intraepitelial escamosa.
SSC : Solución citrato salina.
T : Timina.
t.a. : Temperatura ambiente.
Tm : Temperatura de fusión.
URR : Región reguladora ascendente.
VaIN : Neoplasia intraepitelial vaginal.
VIN : Neoplasia intraepitelial vulvar.
VIN I : Neoplasia intraepitelial vulvar grado I.
VIN II : Neoplasia intraepitelial vulvar grado II.
VIN III : Neoplasia intraepitelial vulvar grado III.

INDICE DE FIGURAS

<u>FIGURA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA</u>
I.1.	Reproducción del libro "De las Enfermedades de los Ejercitos".....	3
I.2.	Comparación de la organización genómica de varios HPV.....	11
I.3.	Tipos de infección genital por HPV.....	15
I.4.	Condilomas acuminados en vulva y región perineal.....	19
I.5.	Imagen colposcópica de lesión acetoblanca en cérvix.....	20
I.6.	Condiloma acuminado de vulva.....	20
I.7.	Condiloma plano de cérvix.....	21
I.8.	LSIL (displasia leve / CIN I).....	24
I.9.	HSIL (displasia moderada / CIN II).....	24
I.10.	HSIL (displasia severa / CIN III).....	25
I.11.	HSIL (Carcinoma <i>in situ</i> / CIN III).....	25
I.12.	Carcinoma escamoso de cérvix bien diferenciado.....	31
I.13.	Carcinoma escamoso de cérvix moderadamente diferenciado.....	31
I.14.	Carcinoma indiferenciado de cérvix.....	32
I.15.	Carcinoma verrucoso de vulva.....	33
I.16.	Adenocarcinoma de cérvix.....	34
I.17.	Imagen colposcópica de lesión yodo-negativa de cérvix...	38
I.18.	Frotis vaginal con un coilocito.....	41
I.19.	Frotis vaginal con un coilocito binucleado.....	41
I.20.	Placa de hiperqueratosis en un frotis vaginal.....	42
I.21.	Frotis cérvico-vaginal diagnosticado de HSIL.....	43
I.22.	Microfotografía electrónica de agrupaciones intranucleares de HPV.....	45
III.1.	Distribución porcentual de biopsias de vulva por procedencias.....	69
III.2.	Distribución porcentual de biopsias de cérvix por procedencias.....	70

<u>FIGURA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA</u>
III.3.	Medida de la longitud de epitelio en una biopsia por análisis de imagen.....	76
IV.1.	Distribución porcentual de lesiones encontradas en vulva.	93
IV.2.	Distribución porcentual de lesiones de vulva compatibles o no con infección por HPV.....	93
IV.3.	Distribución porcentual de lesiones encontradas en cérvix	96
IV.4.	Distribución porcentual de lesiones cervicales compatibles o no con infección por HPV.....	96
IV.5.	Distribución porcentual de lesiones cervicales en biopsias de archivo y de nueva obtención.....	97
IV.6.	Condiloma acuminado de vulva positivo para HPV por inmunohistoquímica.....	100
IV.7.	Detalle de coilocitos positivos para HPV por inmunohistoquímica.....	101
IV.8.	Células CaSki positivas para HPV por hibridación <i>in situ</i>	103
IV.9.	Células HeLa positivas para HPV por hibridación <i>in situ</i> .	104
IV.10.	Condiloma acuminado positivo para HPV por HIS-detección.....	104
IV.11.	Resultados de HIS-detección en biopsias de vulva y cérvix según el tamaño mínimo de las mismas.....	107
IV.12.	Resultados de HIS-detección en lesiones cervicales según la longitud mínima de epitelio.....	108
IV.13.	Resultados de HIS-detección en biopsias cervicales con menos de 5 mm de epitelio, entre 5 y 9 mm y más de 9 mm.....	109
IV.14.	Comparación de los resultados de HIS-detección en lesiones cervicales con menos de 5 mm, entre 5 y 9 mm y más de 9 mm de epitelio.....	110
IV.15.	Resultados porcentual de HIS-tipado en biopsias de cérvix.....	113
IV.16.	Patrón de marcaje uniforme por hibridación <i>in situ</i>	115
IV.17.	Patrón de marcaje puntual por hibridación <i>in situ</i>	115
IV.18.	Patrón de marcaje mixto por hibridación <i>in situ</i>	116
IV.19.	Relación entre patrón de marcaje y tipos virales en condilomas acuminados de vulva.....	117

<u>FIGURA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA</u>
IV.20.	Clasificación de biopsias cervicales por lesiones y patrón de marcaje.....	118
IV.21.	Relación entre tipos virales y patrón de marcaje en biopsias cervicales.....	119
IV.22.	Relación entre tipos virales y patrón de marcaje en condilomas acuminados de cérvix.....	119
IV.23.	Relación entre tipos virales y patrón de marcaje en LSIL.	120
IV.24.	Relación entre tipos virales y patrón de marcaje en HSIL	120
IV.25.	Relación entre tipos virales y patrón de marcaje en carcinomas cervicales.....	121
IV.26.	Patrón de distribución multifocal.....	124
IV.27.	Patrón de distribución aislado.....	125
IV.28.	Relación entre tipos virales y patrón de distribución en condilomas acuminados de vulva.....	126
IV.29.	Clasificación de biopsias de cérvix según el patrón de distribución.....	127
IV.30.	Relación entre tipos virales y patrón de distribución en biopsias de cérvix.....	128
IV.31.	Relación entre tipos virales y patrón de distribución en condilomas acuminados de cérvix.....	129
IV.32.	Relación entre tipos virales y patrón de distribución en LSIL.....	129
IV.33.	Relación entre tipos virales y patrón de distribución en HSIL.....	130
IV.34.	Relación entre tipos virales y patrón de distribución en carcinomas cervicales.....	130
IV.35.	Reacción positiva por hibridación <i>in situ</i> en el tercio superior de un epitelio.....	132
IV.36.	Reacción positiva por hibridación <i>in situ</i> en el tercio medio de un epitelio.....	132
IV.37.	Reacción positiva por hibridación <i>in situ</i> que alcanza el tercio inferior de un epitelio.....	133
IV.38.	Clasificación de biopsias cervicales según la posición relativa de células positivas en el grosor del epitelio.....	135
IV.39.	Relación entre tipos virales y posición relativa de células positivas en el grosor del epitelio en biopsias cervicales...	135

<u>FIGURA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA</u>
IV.40.	Resultados porcentuales de positividad con hibridación <i>in situ</i> e inmunohistoquímica en biopsias de vulva.....	141
IV.41.	Resultados porcentuales de positividad con hibridación <i>in situ</i> e inmunohistoquímica en biopsias de cérvix.....	141
IV.42.	Comparación de las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación <i>in situ</i> en un condiloma acuminado de vulva.	142
IV.43.	Relación entre patrón de marcaje y compatibilidad con infección por HPV en biopsias cervicales.....	145
IV.44.	Relación entre patrón de distribución y compatibilidad con infección por HPV en biopsias cervicales.....	146
IV.45.	Combinación de inmunohistoquímica e hibridación <i>in situ</i> en una biopsia de cérvix.....	150
IV.46.	Detalle del doble marcaje en una biopsia de vulva.....	151

INDICE DE TABLAS

<u>TABLA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA</u>
I.I.	Estructura de la familia Papovaviridae.....	8
I.II.	Organización genómica de los virus del papiloma.....	12
I.III.	Sistemas de clasificación de lesiones cervicales premalignas.....	27
I.IV.	Técnicas utilizadas en el diagnóstico de la infección genital por HPV.....	37
I.V.	Técnicas de biología molecular empleadas en el diagnóstico de la infección por HPV.....	59
III.I.	Distribución de las biopsias estudiadas por procedencias.....	69
IV.I.	Clasificación de biopsias de vulva por lesiones.....	92
IV.II.	Clasificación de biopsias de cérvix por lesiones.....	95
IV.III.	Clasificación de las biopsias según la longitud de su epitelio.....	98
IV.IV.	Clasificación de biopsias de vulva por lesiones y longitud de epitelio.....	99
IV.V.	Clasificación de biopsias de cérvix por lesiones y longitud de epitelio.....	99
IV.VI.	Resultado de la inmunohistoquímica en biopsias de vulva.....	102
IV.VII.	Resultado de la inmunohistoquímica en biopsias de cérvix.....	102
IV.VIII.	Resultado de la HIS-detección en biopsias de vulva...	105
IV.IX.	Resultado de la HIS-detección en biopsias de cérvix..	106
IV.X.	Relación entre HIS-detección y longitud de epitelio....	107
IV.XI.	Relación entre HIS-detección y longitud de epitelio en lesiones cervicales.....	108
IV.XII.	Resultados de HIS-tipado en biopsias de vulva.....	111
IV.XIII.	Resultados de HIS-tipado en biopsias cervicales.....	112
IV.XIV.	Resultados de HIS-tipado en biopsias cervicales sin infección múltiple.....	113

<u>TABLA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA</u>
IV.XV.	Clasificación de biopsias de vulva por lesiones y por patrón de marcaje.....	116
IV.XVI.	Relación entre tipos virales y patrón de marcaje en biopsias de vulva.....	117
IV.XVII.	Clasificación de biopsias cervicales según la inmunohistoquímica y el patrón de marcaje.....	121
IV.XVIII.	Clasificación de las biopsias estudiadas por lesiones según el patrón de marcaje puntual.....	122
IV.XIX.	Clasificación de las biopsias estudiadas por lesiones según el patrón de marcaje uniforme.....	122
IV.XX.	Clasificación de biopsias de vulva según el patrón de distribución.....	125
IV.XXI.	Relación entre tipos virales y patrón de distribución en biopsias de vulva.....	126
IV.XXII.	Clasificación de biopsias cervicales por inmunohistoquímica y patrón de distribución.....	131
IV.XXIII.	Clasificación de biopsias de vulva según la posición relativa de células positivas en el grosor del epitelio..	134
IV.XXIV.	Relación entre tipos virales y posición relativa de células positivas en el grosor del epitelio en biopsias de vulva.....	134
IV.XXV.	Clasificación de biopsias de cérvix según los patrones de marcaje y distribución.....	136
IV.XXVI.	Relación entre tipos virales y patrones de marcaje y distribución en biopsias de cérvix.....	137
IV.XXVII.	Clasificación de las biopsias estudiadas por patrones de marcaje y distribución.....	137
IV.XXVIII.	Comparación entre inmunohistoquímica e hibridación <i>in situ</i> en biopsias de vulva.....	139
IV.XXIX.	Comparación entre inmunohistoquímica e hibridación <i>in situ</i> en biopsias de cérvix.....	139
IV.XXX.	Comparación de resultados obtenidos en biopsias de vulva compatibles o no con infección por HPV.....	144
IV.XXXI.	Comparación de resultados obtenidos en biopsias de cérvix compatibles o no con infección por HPV.....	144

<u>TABLA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA</u>
IV.XXXII.	Resultados de HIS-tipado en biopsias cervicales compatibles o no con infección por HPV.....	145
IV.XXXIII.	Comparación de resultados en biopsias de vulva de archivo y nueva obtención.....	147
IV.XXXIV.	Comparación de resultados en biopsias de cérvix de archivo y nueva obtención.....	147
IV.XXXV.	Resultados de inmunohistoquímica en biopsias cervicales por procedencias.....	148
IV.XXXVI.	Resultados de HIS-detección en biopsias cervicales por procedencias.....	149
IV.XXXVII.	Resultados de HIS-tipado en biopsias cervicales por procedencias.....	149
V.I.	Comparación de resultados obtenidos por diversos autores con hibridación <i>in situ</i> en biopsias cervicales..	165
V.II.	Comparación de resultados obtenidos por diversos autores con HIS-tipado en biopsias cervicales.....	174
V.III.	Estrategias utilizadas por diversos autores para combinar inmunohistoquímica e hibridación <i>in situ</i>	198

INDICE

	<u>PAGINA</u>
I. INTRODUCCION	1
I.1. INFECCION GENITAL POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO: PERSPECTIVA HISTORICA.....	2
I.2. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.....	7
I.2.1. Taxonomía.....	7
I.2.2. Clasificación.....	8
I.2.3. Estructura del virión.....	9
I.2.4. Organización del genoma.....	10
I.2.5. Biología viral.....	13
I.2.5.1. Infección latente.....	14
I.2.5.2. Infección productiva.....	16
I.2.5.3. Infección no productiva.....	17
I.3. LESIONES GENITALES ASOCIADAS A HPV.....	18
I.3.1. Condiloma.....	19
I.3.2. Lesiones no invasivas con potencialidad de evolución maligna.....	22
I.3.2.1. Terminología clásica.....	22
I.3.2.2. Clasificación CIN.....	26
I.3.2.3. Sistema de Bethesda.....	27
I.3.3. Lesiones invasivas.....	29
I.3.3.1. Carcinoma escamoso de cérvix.....	29
I.3.3.2. Carcinoma verrucoso.....	32
I.3.3.3. Carcinoma de células pequeñas.....	33
I.3.3.4. Adenocarcinoma de cérvix.....	33
I.3.4. Tipos de HPV asociados con diferentes lesiones.....	34
I.4. DIAGNOSTICO DE LA INFECCION GENITAL POR HPV.....	36
I.4.1. Observación clínica de las lesiones.....	37
I.4.1.1. Observación directa.....	37

	<u>PAGINA</u>
I.4.1.2. Colposcopia.....	38
I.4.2. Diagnóstico anatomopatológico.....	40
I.4.2.1. Citología exfoliativa cérvico-vaginal.....	40
I.4.2.2. Biopsia genital.....	44
I.4.3. Microscopia electrónica.....	45
I.4.4. Métodos inmunológicos.....	46
I.4.4.1. Serología.....	46
I.4.4.2. Inmunohistoquímica (IHQ).....	48
I.4.5. Hibridación de ácidos nucleicos.....	49
I.4.5.1. Teoría de hibridación.....	50
I.4.5.2. Southern blot.....	52
I.4.5.3. Dot blot.....	53
I.4.5.4. Reverse blot.....	54
I.4.5.5. Hibridación <i>in situ</i> en tejido (HIS).....	55
I.4.5.6. Hibridación <i>in situ</i> en filtro.....	60
I.4.5.7. Técnica sandwich.....	60
I.4.6. Amplificación de ADN: reacción en cadena de la polimerasa.....	61
II. OBJETIVOS	63
III. MATERIAL Y METODOS	66
III.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	67
III.2. MATERIAL.....	68
III.2.1. Biopsias genitales.....	68
III.2.1.1. Biopsias de archivo.....	70
III.2.1.2. Biopsias de nueva obtención.....	71
III.2.2. Líneas celulares.....	72
III.3. METODOS.....	72
III.3.1. Pretratamiento de los portaobjetos.....	73
III.3.2. Cultivo y procesamiento de las líneas celulares.....	74
III.3.3. Análisis de imagen.....	75
III.3.4. Inmunohistoquímica.....	77

	<u>PAGINA</u>
III.3.5. Hibridación <i>in situ</i>	80
III.3.5.1. Técnica de detección.....	80
III.3.5.2. Técnica de tipado.....	84
III.3.6. Detección simultánea de antígenos y secuencias de ADN específicas de HPV.....	87
III.2.7. Estadística.....	89
IV. RESULTADOS	90
IV.1. CLASIFICACION DE LAS LESIONES.....	91
IV.1.1. Biopsias de vulva.....	91
IV.1.2. Biopsias de cérvix uterino.....	94
IV.2. LONGITUD DE EPITELIO.....	97
IV.3. INMUNOHISTOQUIMICA.....	100
IV.3.1. Biopsias de vulva.....	101
IV.3.2. Biopsias de cérvix uterino.....	102
IV.4. HIBRIDACION <i>IN SITU</i>	103
IV.4.1. Técnica de detección.....	103
IV.4.1.1. Biopsias de vulva.....	105
IV.4.1.2. Biopsias de cérvix uterino.....	105
IV.4.1.3. Relación entre la técnica de HIS-detección para HPV y la longitud del epitelio presente en las biopsias.....	106
IV.4.2. Técnica de tipado.....	110
IV.4.2.1. Biopsias de vulva.....	111
IV.4.2.2. Biopsias de cérvix uterino.....	111
IV.5. PARAMETROS MORFOLOGICOS ASOCIADOS A LA HIBRIDACION <i>IN SITU</i>	114
IV.5.1. Patrón de marcaje.....	114
IV.5.1.1. Biopsias de vulva.....	116
IV.5.1.2. Biopsias de cérvix uterino.....	118
IV.5.1.3. Resultados globales.....	122
IV.5.2. Patrón de distribución de las células positivas.....	124
IV.5.2.1. Biopsias de vulva.....	125

	<u>PAGINA</u>
IV.5.2.2. Biopsias de cérvix uterino.....	127
IV.5.3. Posición relativa de las células positivas en el grosor del epitelio.....	131
IV.5.3.1. Biopsias de vulva.....	133
IV.5.3.1. Biopsias de vulva.....	133
IV.5.3.2. Biopsias de cérvix uterino.....	134
IV.5.4. Relación entre el patrón de marcaje y el patrón de distribución.....	136
IV.6. ESTUDIOS COMPARATIVOS.....	138
IV.6.1. Comparación entre inmunohistoquímica e hibridación <i>in</i> <i>situ</i>	138
IV.6.2. Comparación entre biopsias compatibles y no compatibles histopatológicamente con infección por HPV.....	143
IV.6.3. Comparación entre muestras de archivo y de nueva obtención.....	146
IV.6.4. Procedencia geográfica.....	148
IV.7. TECNICA DE DOBLE MARCAJE.....	150
V. DISCUSION	152
V.1. CLASIFICACION DE LAS LESIONES.....	155
V.2. LONGITUD DE EPITELIO.....	158
V.3. INMUNOHISTOQUIMICA.....	160
V.4. HIBRIDACION <i>IN SITU</i>	163
V.4.1. Técnica de detección.....	163
V.4.1.1. Relación entre la técnica de HIS-detección para HPV y la longitud del epitelio presente en las biopsias.....	167
V.4.2. Técnica de tipado.....	170
V.4.2.1. Biopsias de vulva.....	172
V.4.2.2. Biopsias de cérvix uterino.....	173
V.5. PARAMETROS MORFOLOGICOS ASOCIADOS A LA HIBRIDACION <i>IN SITU</i>	175
V.5.1. Patrón de marcaje.....	175
V.5.1.1. Biopsias de vulva.....	179
V.5.1.2. Biopsias de cérvix uterino.....	180

	<u>PAGINA</u>
V.5.1.3. Resultados globales.....	181
V.5.2. Patrón de distribución de las células positivas.....	182
V.5.2.1. Biopsias de vulva.....	184
V.5.2.2. Biopsias de cérvix uterino.....	184
V.5.3. Posición relativa de las células positivas en el grosor del epitelio.....	186
V.5.3.1. Biopsias de vulva.....	186
V.5.3.2. Biopsias de cérvix uterino.....	186
V.5.4. Relación entre el patrón de marcaje y el patrón de distribución.....	187
V.6. ESTUDIOS COMPARATIVOS.....	188
V.6.1. Comparación entre inmunohistoquímica e hibridación <i>in</i> <i>situ</i>	188
V.6.2. Comparación entre biopsias compatibles y no compatibles histopatológicamente con infección por HPV.....	192
V.6.3. Comparación entre muestras de archivo y muestras de nueva obtención.....	195
V.6.4. Procedencia geográfica.....	196
V.7. TECNICA DE DOBLE MARCAJE.....	196
V.8. CONSIDERACIONES GLOBALES.....	199
VI. CONCLUSIONES	206
VII. BIBLIOGRAFIA	211

I. INTRODUCCION

I.1. INFECCION GENITAL POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO: PERSPECTIVA HISTORICA.

Los virus del papiloma constituyen un grupo de virus, cuyo material genético está constituido por ácido desoxirribonucleico (ADN), que infectan piel y mucosas y producen lesiones escamo-proliferativas en el hombre y en una gran variedad de animales.

La infección por el virus del papiloma humano (HPV, de la terminología inglesa "human papillomavirus") se ha descrito en un amplio abanico de localizaciones anatómicas, que incluye la región anogenital, uretra, piel, cavidades nasal y paranasal, cavidad oral, laringe, árbol traqueobronquial, esófago y conjuntiva¹⁻⁹.

La infección genital por HPV es una de las enfermedades de transmisión sexual más común hoy día y tiene una gran importancia sanitaria ya que este virus puede jugar un papel importante en el desarrollo de lesiones intraepiteliales escamosas y carcinomas¹⁰⁻¹³.

La relación entre actividad sexual y aparición de papilomas genitales era ya conocida en la época romana. Celso, en su "Libro VI de la Medicina"¹⁴ señala que "*...el condiloma es una excrescencia que de ordinario se origina después de una inflamación*".

En el siglo XVIII, el barón Van-Svvieten hace referencia en su libro "De las Enfermedades de los Ejércitos"¹⁵ a las verrugas venéreas como pequeñas elevaciones que se forman en las papilas nerviosas de las partes genitales, y previamente señala que las causas del mal venéreo (en el que se incluyen las verrugas) son siempre un contagio (figura I.1).

A mediados del siglo XIX (1846), en el libro "Nuevos Elementos de Cirugía y Medicina"¹⁶, escrito por "algunos doctores en ambas ciencias", se encuentra ya

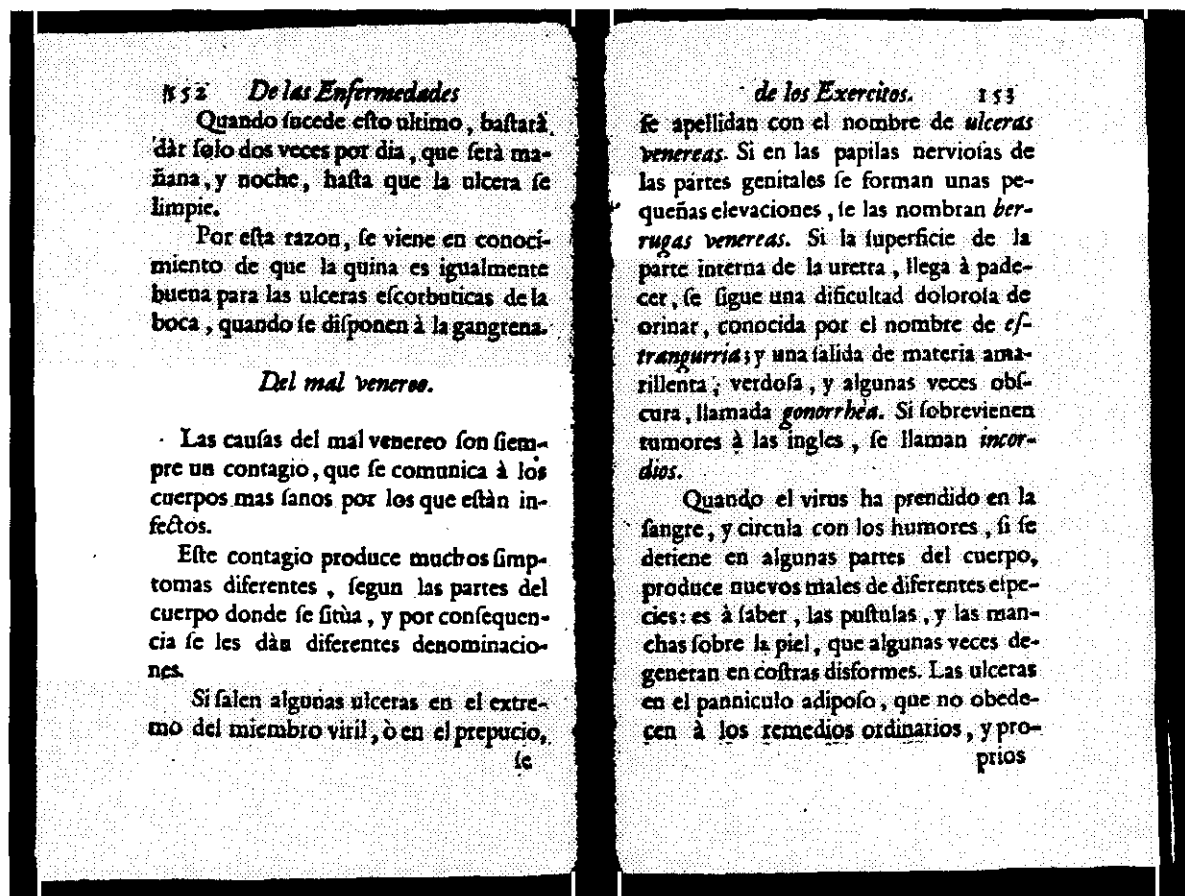


Figura I.1. Reproducción de las páginas del libro "De las Enfermedades de los Ejercitos" en las que se hace referencia a las verrugas venéreas.

una referencia a la transformación maligna de algunas verrugas.

Por la misma época (1848) Díaz Benito y González y Velasco¹⁷ escriben que "... la sangre que arrojan las verrugas es contagiosa. ... porque la sangre detenida allí debe alterarse en su cualidad, y comunicar cuando se pone en contacto con lo restante de la piel, un principio morbífico, absorbiéndose y dando lugar a un producto igual que el que le dio origen". Estos autores hacen también una breve descripción histológica de las verrugas.

Una descripción mucho más amplia de estas lesiones se encuentra, a finales del siglo XIX (1885) en el "Tratado Elemental de Histología Normal y

Patológica" del Dr. Maestre-de San Juan¹⁸, aunque no menciona ninguna etiología de las mismas.

En 1894, Variot¹⁹ demostró que las verrugas cutáneas podían transmitirse de persona a persona por inoculación de suspensiones celulares. Y a principios del siglo XX (1907) Ciuffo²⁰ observó que esta transmisión se podía realizar por inoculación de filtrados libres de células en los que además se eliminaban bacterias y levaduras, sugiriendo por primera vez el origen viral de estas lesiones.

Gross, en su libro "Oncogenic Viruses"²¹ cita un experimento realizado por Waelsch en 1917. Este investigador preparó una suspensión celular a partir de un condiloma acuminado genital y la inoculó en la piel de su propio brazo, en la de uno de sus colaboradores y en la mucosa adyacente al orificio vaginal de una voluntaria joven. Tras un período de tres meses de latencia, el Dr. Waelsch y su colaborador desarrollaron una verruga plana en el sitio de la inoculación, y la voluntaria desarrollo un condiloma acuminado típico. Al poco tiempo, en 1924, Serra²² demostró que el condiloma acuminado también se transmitía mediante filtrados libres de células.

En 1933, Shope²³ describió por primera vez papilomas en conejos ligados a un agente transmisible: el virus del papiloma.

Un año después (1934), Rous y Beard^{24,25} descubrieron que los papilomas de conejo tenían potencial maligno. Implantaron pequeños fragmentos de papilomas cutáneos de conejo en músculos y órganos internos de conejos y comprobaron que adquirían propiedades invasivas. Los fragmentos crecieron en los tejidos de alrededor e incluso se transformaron en carcinomas de células escamosas. Un año más tarde, en 1935, los mismos autores²⁶ informaron que algunos papilomas cutáneos de conejos domésticos, producidos por inoculación de filtrados de otros papilomas obtenidos en conejos salvajes, experimentaban una transformación espontánea a carcinoma de células escamosas.

Desde mediados del siglo XX, el diagnóstico citológico de las lesiones

precancerosas evolucionó rápidamente. En 1949, Ayer²⁷ describió cambios citológicos asociados a estadíos "precancerosos" tempranos, pero sin hablar todavía de "atipia coilocítica". Esta fue descrita por primera vez por Koss y Durfee²⁸ en 1956, asociada a un gran porcentaje de displasias cervicales. Y en 1960, Ayer²⁹ hipotetizó que la atipia coilocítica tenía un origen viral. Finalmente, en 1961, Naib y Masukawa³⁰ centraron el diagnóstico citológico del condiloma acuminado en la presencia de coilocitos.

En la década de los 70 varios autores señalaron la estrecha relación entre enfermedad venérea y carcinoma cervical y vulvar³¹⁻³³.

En 1976, Meisels y Fortin³⁴, y en 1977, Purola y Savia³⁵, identificaron la atipia coilocítica como un marcador de la infección genital por HPV.

También en 1976, zur Hausen³⁶ sugirió que el HPV era el principal virus oncogénico en el tracto genital.

A finales de los 70, se caracterizaron los primeros tipos de HPV genitales³⁷⁻⁴⁰ y en 1981, De Villiers, Gissman y zur Hausen⁴¹ publicaron la primera clonación del ADN de un HPV genital.

A partir de este momento, numerosos estudios ultraestructurales, inmunohistoquímicos y de hibridación de ácidos nucleicos demostraron la presencia de viriones, antígenos de la cápside y ADN de HPV, respectivamente, en un porcentaje elevado de condilomas, lesiones precancerosas y carcinomas genitales⁴²⁻⁴⁶.

En los últimos años se han identificado más de 65 tipos distintos de HPV⁴⁷, de los que 24 se han aislado en el tracto anogenital^{47,48} (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 y 59), y se ha establecido una estrecha relación entre determinados tipos de HPV y el desarrollo de procesos neoplásicos genitales. En este sentido, varios grupos han conseguido transformar líneas celulares continuas con HPV tipos 6⁴⁹, 16⁵⁰⁻⁵³ y

18^{49,51,54}; igualmente, otros grupos han conseguido transformar queratinocitos primarios con HPV tipos 16 y 18^{55,56}; y recientemente, se ha demostrado que el HPV tipo 16 es capaz de alterar la diferenciación epitelial en un modelo experimental *in vitro*⁵⁷.

A nivel molecular se ha demostrado la interacción de proteínas víricas con productos génicos de la célula huésped relacionadas con procesos neoplásicos. Concretamente se ha descrito la unión de las proteínas E6 y E7 de HPV 16 a la proteína del retinoblastoma⁵⁸ y a la proteína p53⁵⁹.

Dada la incapacidad para cultivar el virus *in vitro*, sobre líneas celulares, los estudios sobre el papel potencial de los productos génicos de HPV en la transformación neoplásica y la carcinogénesis se realizan sobre sistemas alternativos, como son el cultivo de queratinocitos transfectados^{60,61}, modelos experimentales que permiten la maduración de queratinocitos y reproducen las propiedades de crecimiento del epitelio escamoso⁵⁷, ratones transgénicos⁶², etc. Recientemente, se ha descrito un modelo experimental para producir infecciones productivas en ratones desnudos⁶³.

En la actualidad, la infección genital por HPV es una de las enfermedades de transmisión sexual más frecuente y su incidencia tiene un incremento progresivo, relacionado probablemente con los cambios sufridos en las costumbres sexuales, hasta el punto de que existe un reconocimiento unánime internacional de que estamos ante un desarrollo epidémico de esta enfermedad.

En Inglaterra, un informe del Departamento de Salud y Seguridad Social⁶⁴ señala un incremento del 250% en la incidencia de condiloma acuminado entre 1979 y 1982. En Australia, Evans y Dowling⁶⁵ refieren un aumento de esta misma patología desde el 0.58% en 1979 al 5.6% en 1988. Becker⁶⁶ encuentra una incidencia de infección por HPV en América Latina del 9%.

En España los datos sobre esta infección son escasos. Matorras⁶⁷ apunta una prevalencia del 1-2% y Cancelo⁶⁸ del 2.5%.

Esta enfermedad representa un grave problema sanitario debido a la transformación maligna que experimentan algunas lesiones derivadas de la infección por HPV. Por este motivo, una parte importante de las investigaciones están encaminadas al desarrollo de técnicas diagnósticas sencillas, que puedan usarse rutinariamente y que permitan la detección precoz de la infección, y a la búsqueda de parámetros clínicos y biológicos que aporten una orientación pronóstica sobre la evolución de una lesión.

I.2. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.

I.2.1. TAXONOMIA.

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus, en su quinto informe⁶⁹, incluye el HPV entre los virus de vertebrados con ADN bicatenario circular, sin envuelta, familia *Papopaviridae* (tabla I.I), género *Papillomavirus*⁶⁹. La especie tipo del género es el virus del papiloma del conejo.

Las características principales del género se resumen a continuación^{69,70}:

- Peso molecular del ADN: 5×10^6 dalton.
- Contenido en G+C: 40-50%.
- Diámetro de la cápside: 50-55 nm.
- Densidad de flotación en CsCl: 1.34 g/cm^3 .
- Resistentes a éter, ácido y calor.
- No se conoce sistema celular de cultivo *in vitro*.
- Cada especie contiene un antígeno de superficie distinto, pero todos los miembros del género poseen un antígeno común que se demuestra en viriones rotos.
- Pueden transmitirse mecánicamente por artrópodos.

FAMILIA	GENERO	ESPECIE
Papovaviridae	Papillomavirus	Virus del papiloma del conejo *
		Virus del papiloma humano
		Virus del papiloma del ciervo
		Virus del papiloma del perro
		Virus del papiloma del caballo
		Virus del papiloma de la rata
		Virus del papiloma de la cabra
		Virus del papiloma de la oveja
	Polyomavirus	Virus del polioma del ratón *
		BK y JC (humanos)
		K (ratón)
		RKV (conejo)
		HaPV (hámster)
		SV40 (mono rhesus)
		STMV (macaco de cola)
		LPV (mono verde)
		SA12 (babuino)

Tabla 1.1. Estructura de la familia *Papovaviridae*. Las especies marcadas con asterisco son las especies tipo de cada género.

1.2.2. CLASIFICACION.

Los virus del papiloma se clasifican según su huésped natural y según la homología de secuencia de su ADN. Así, cada virus se nombra con las siglas PV (de la terminología inglesa "papillomavirus") precedida de la inicial del nombre en inglés de la especie que infecta. Por ejemplo, HPV ("human papillomavirus") para el virus del papiloma humano, BPV ("bovine papillomavirus") para el virus del papiloma bovino, DPV ("deer papillomavirus") para el virus del papiloma del ciervo, etc.

Los virus del papiloma aislados de una misma especie se clasifican en tipos en virtud de la homología en su secuencia de nucleótidos⁷¹ y se numeran correlativamente (por ejemplo, HPV 1, HPV 2, etc.). Para esta clasificación no es posible utilizar criterios serológicos porque no se dispone de anticuerpos

específicos de la mayoría de los tipos de virus. En consecuencia, para establecer la identidad de un nuevo aislado se lleva a cabo el siguiente procedimiento⁷²:

1. El ADN de HPV recién aislado se hibrida en solución en condiciones estrictas con una panel de ADN marcado isotópicamente correspondiente a tipos conocidos de HPV.
2. Las mezclas de reacción se tratan a continuación con nucleasa S1, que digiere el ADN monocatenario.
3. Se mide el porcentaje de ADN radiomarcado, que corresponde al ADN de cada tipo conocido de HPV que ha hibridado con el ADN del HPV en estudio y que, por lo tanto, habrá quedado protegido de la acción de la nucleasa S1.

Por definición, un ADN vírico que muestre menos del 50% de homología con el resto de los tipos de HPV conocidos se considera un nuevo tipo y se le asigna el número que le corresponda por orden de descubrimiento. Un ADN que presente un grado de homología comprendido entre el 50 y el 100% con un tipo conocido de HPV se considera un subtipo de aquél y se designa con el mismo número y la letra minúscula que le corresponda (por ejemplo, HPV 6a, HPV 6b, etc.). Un ADN que presente un grado de homología prácticamente del 100% con un tipo conocido de HPV se considera una variante del mismo tipo viral^{48,72}.

I.2.3. ESTRUCTURA DEL VIRION.

El virión del HPV está constituido por un núcleo central de ADN encerrado dentro de una cápside proteica constituida por 72 subunidades o capsómeros, dispuestos según una simetría icosaédrica, que le confiere una forma prácticamente esférica cuando se observa con microscopía electrónica⁷³. El virión maduro carece de envuelta externa.

El análisis bioquímico revela que la partícula carece de lípidos y carbohidratos, y contiene varias proteínas con pesos moleculares que oscilan entre 10 y 76×10^3 dalton. Las proteínas de bajo peso molecular corresponden a histonas procedentes de la célula huésped, y las de alto peso molecular corresponden a proteínas estructurales del virus.

La cápside viral está constituida por dos proteínas estructurales diferentes: una proteína principal, con un peso molecular de 54.000 dalton, y una proteína secundaria, con un peso molecular de 76.000 dalton⁷³. Los antisueros obtenidos contra la proteína principal desnaturalizada dan reacción cruzada con todos los virus del papiloma, tanto humanos como animales, por lo que se considera un antígeno específico de género^{43,74}. Por el contrario, la proteína secundaria es altamente específica de tipo y puede ser utilizada en el futuro como diana para el tipado inmunohistoquímico de las infecciones producidas por HPV⁷³.

1.2.4. ORGANIZACION DEL GENOMA.

El genoma de los virus del papiloma está constituido por una molécula de ADN circular, bicatenaria, de una longitud aproximada de 8.000 pares de bases y un peso molecular de 5.2×10^6 dalton⁷³.

El ADN está combinado con histonas procedentes de la célula huésped y condensado en nucleosomas⁷⁵. Si se eliminan las histonas, el ADN adquiere una estructura superenrollada (forma I). La rotura de una de las cadenas mediante endonucleasas de restricción origina un círculo relajado (forma II) y la rotura de ambas cadenas por el mismo sitio origina una molécula lineal (forma III). Estas tres formas de ADN viral pueden ser detectadas electroforéticamente por su distinta movilidad^{45,76}.

El análisis de la secuencia de ADN de varios tipos de virus del papiloma, animales y humanos, demuestra que, a pesar de las grandes variaciones en

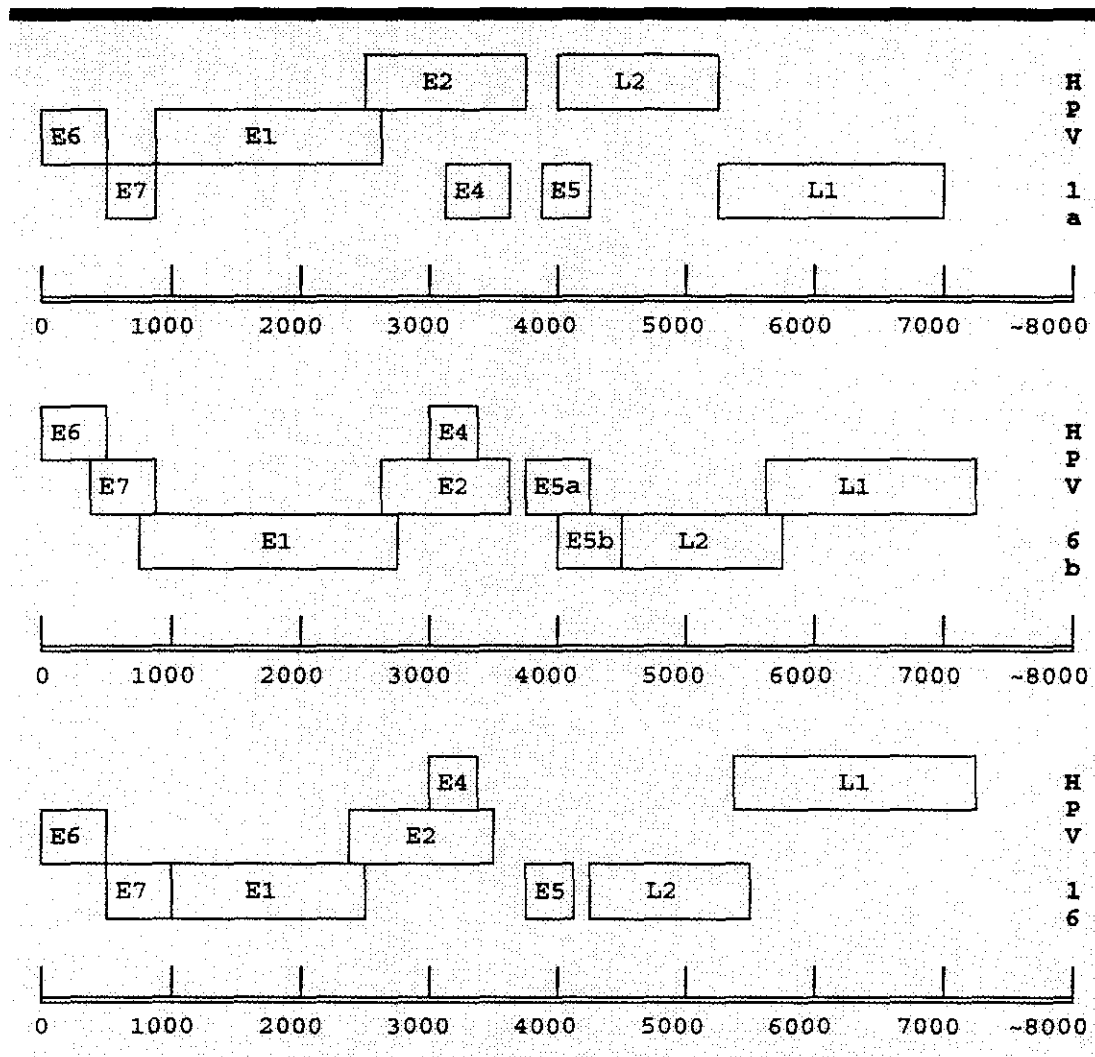


Figura 1.2. Comparación de la organización genómica de varios HPV. (Adaptado de referencias 89 y 93).

homología, la organización genómica está muy conservada en estos virus⁷⁷⁻⁸⁰ (Fig. 1.2).

Funcionalmente, el genoma de estos virus está dividido en tres regiones^{48,81,82} (tabla I.II):

1. Región temprana o región E (del término inglés "early"), que representa alrededor del 45% del genoma y contiene 8 unidades potenciales de transcripción (ORF, de la terminología inglesa "open reading frames"), que codifican para proteínas con función reguladora (E1 y E2)^{45,83-85},

REGION	ORF	FUNCION
E	E1	Regulación de la replicación viral; conservación del episoma.
	E2	Regulación de la transcripción; codifica una proteína que se une a DNA.
	E3	Desconocida.
	E4	Codifica una proteína citoplásmica con una posible función en la maduración viral.
	E5	Transformación celular; control del número de copias en forma episómica.
	E6	Transformación celular; control del número de copias en forma episómica.
	E7	Inmortalización celular; activador de la transcripción.
	E8	Posible función en la replicación viral.
L	L1	Codifica para la proteína principal de la cápside.
	L2	Codifica para la proteína secundaria de la cápside.

Tabla I.II. Resumen de la organización genómica de PV, con indicación de las regiones en que se divide el genoma, unidades potenciales de transcripción y sus correspondientes funciones.

con actividad transformante potencial (E5, E6 y E7)⁸⁶⁻⁹³ o de función desconocida (E3, E4 y E8).

2. Región tardía o región L (del término inglés "late"), que representa alrededor del 40% del genoma y contiene dos ORF: L1, que codifica para la proteína estructural principal de la cápside, y L2, que codifica para la proteína estructural secundaria de la cápside^{45,94}.
3. Región reguladora ascendente (URR, de la terminología inglesa "upstream regulatory region"), comprendida entre el extremo 3' del ORF L1 y el extremo 5' del ORF E6, sin función codificante, pero que contiene elementos reguladores. Se la denomina también región control

larga (LCR, de la terminología inglesa "long control region") y región no codificante (NCR, de la terminología inglesa "non-coding region"). Esta región contiene un origen de replicación; dos orígenes de transcripción; elementos promotores para ADN polimerasa II, incluyendo secuencias TATA y CAAT; y un dominio rico en GT con una señal de poliadenilación para transcritos de la región L^{95,96}.

I.2.5. BIOLOGIA VIRAL.

Todo el epitelio escamoso del tracto genital es susceptible de infección por HPV. Sin embargo, la zona más vulnerable es la unión escamo-columnar, en particular las zonas de metaplasia escamosa³². No se conoce todavía con exactitud cómo se produce la infección, aunque se piensa que ésta se inicia en las células replicativas de la capa basal del epitelio y que el virus alcanza estas células a través de defectos en la mucosa superficial (erosiones, microlesiones, cervicitis, etc.). Esta hipótesis se apoya en dos hallazgos⁹⁶.

- Se ha demostrado la presencia de ADN y ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de HPV en células basales de tejidos infectados.
- La infección experimental de epitelio escamoso por HPV se potencia alterando la superficie epitelial antes de la exposición al virus.

Aunque las células epiteliales escamosas parecen ser la diana principal de HPV, hay también pruebas a favor de que la infección puede ocurrir en las células epiteliales de reserva indiferenciadas que darán origen al componente escamoso y glandular de la mucosa cervical. Esto explicaría la presencia de HPV en adenocarcinomas y carcinomas de células pequeñas indiferenciadas⁹⁷⁻⁹⁹.

El hecho de que ciertos tipos de HPV genitales no se observen en otras localizaciones extragenitales parece indicar que estos tipos virales requieren

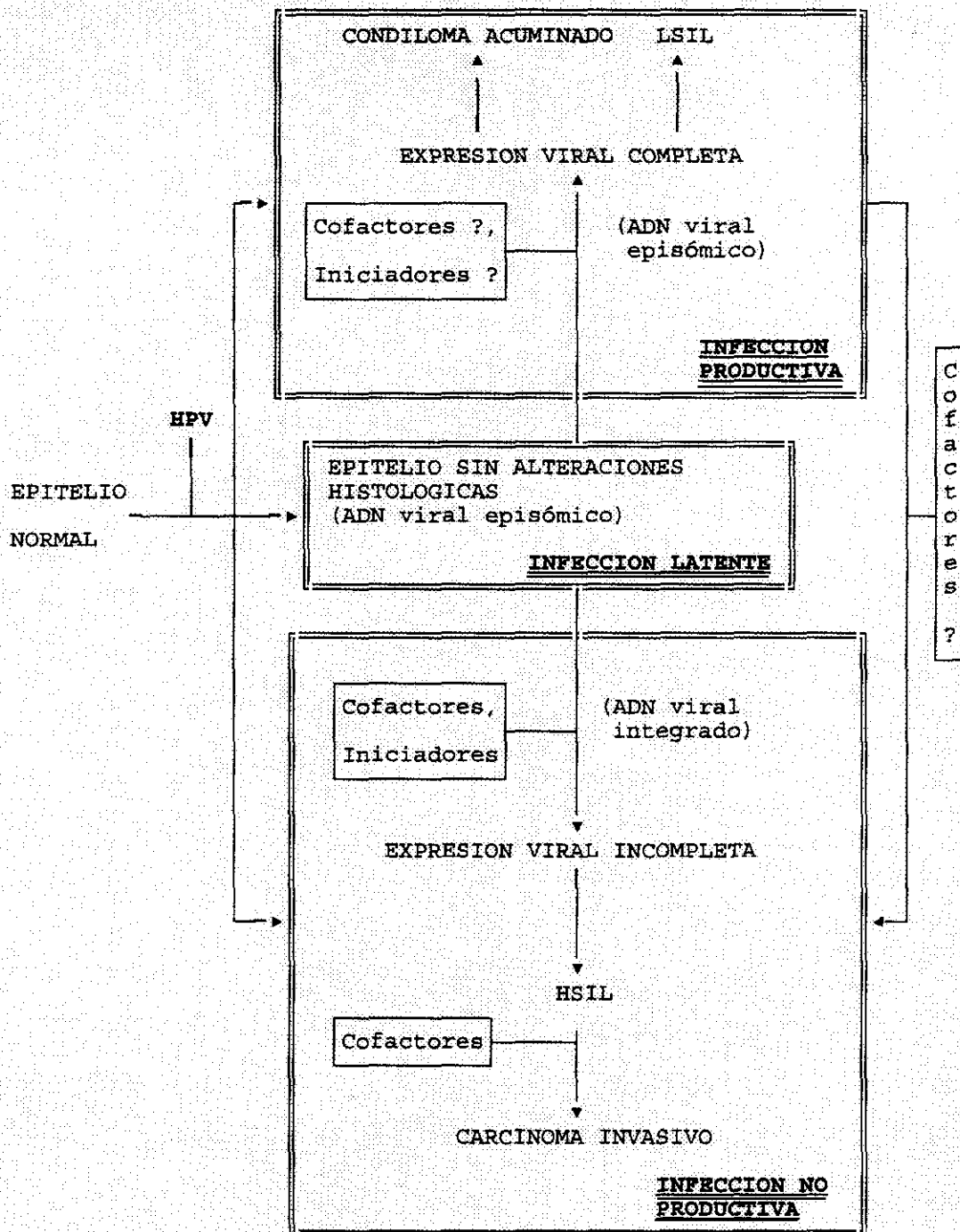
características específicas del epitelio diana para que la infección se produzca. Esto hace pensar en la posible existencia de receptores específicos en este epitelio para estos virus y/o un microambiente especial que favorecería la infección por determinados tipos de HPV⁹⁶. El mecanismo de infección implicaría la unión del virus a la superficie de la célula diana, con gran probabilidad a nivel de receptores de membrana específicos, la internalización del virus en la célula, la apertura de la cápside y la liberación del ADN vírico en el núcleo de la célula infectada en forma de episoma^{96,100}. A partir de este momento, y dependiendo de varios factores, se pueden producir tres tipos de infección: latente, productiva y no productiva (figura 1.3).

1.2.5.1. Infección latente.

Desde que se produce la infección genital por un tipo de HPV hasta que se desarrolla una lesión pasa un período de tiempo que varía desde unas pocas semanas a varios meses e incluso años^{63,101}. Esto permite definir la infección latente como la presencia de ADN de HPV en células de un epitelio sin alteraciones clínicas ni histológicas detectables.

Se ha demostrado la presencia de ADN de HPV en epitelio genital normal de pacientes con historia de condilomas de repetición¹⁰², y en zonas de epitelio histológicamente normales cercanas a carcinomas genitales asociados a HPV^{103,104}. Sin embargo, dado que en todos estos casos los pacientes presentaban o habían presentado lesiones asociadas a HPV, la presencia de ADN viral en zonas de epitelio normal puede ser debida a contaminación por material celular de la zona infectada o a una extensión del virus desde las zonas morfológicamente anormales a las adyacentes.

Estudios posteriores demostraron la existencia de ADN de HPV en epitelio cervical normal de pacientes que no tenían historia previa de lesiones asociadas a HPV¹⁰⁵⁻¹¹⁶. En estos trabajos el porcentaje de pacientes con infección latente



LSIL = Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado.
HSIL = Lesión intraepitelial escamosa de alto grado.

Figura 1.3. Esquema de los posibles tipos de infección genital por HPV.

varía desde el 4.5%¹⁰⁹ al 29%¹⁰⁷, con un valor medio alrededor del 10%. El ADN viral presente en este tejido normal es episómico y hasta el momento no se ha estudiado el nivel de expresión del genoma vírico en este tipo de infección.

Tampoco está claro si la ausencia de lesiones durante un período largo de tiempo es debido a bajo potencial patogénico de los virus que producen este tipo de infección o a factores inmunológicos del paciente.

I.2.5.2. Infección productiva.

La infección productiva por HPV se caracteriza por tres hechos:

1. Mantenimiento del genoma vírico en forma episómica.
2. Expresión completa del genoma vírico.
3. Producción de nuevas partículas víricas.

La expresión del genoma vírico comienza por los genes de la región temprana, sintetizándose proteínas reguladoras que a nivel celular determinan una mayor proliferación de las células infectadas, y a nivel del ADN vírico potencian la replicación viral, con aumento del número de copias del genoma vírico en forma episómica. Histológicamente, esto se traduce en hiperplasia de las células basales y acantosis^{117,118}.

A continuación se expresan los genes de la región tardía, y se sintetizan las proteínas de la cápside. Al final se produce el ensamblaje de los nuevos viriones, que pueden ser detectados por microscopía electrónica e inmunohistoquímica^{44,46,119}.

El proceso de maduración viral está íntimamente ligado al proceso de

maduración epitelial. De hecho, el ensamblaje de los viriones se produce sólo en células epiteliales escamosas diferenciadas del tercio superior del epitelio^{44,120}. Durante el tránsito de la capa basal a la superficie, la célula escamosa sufre una serie de cambios complejos, incluido la producción de citoqueratinas⁶³, que determinan la aparición de un microambiente intracelular adecuado para la producción de nuevas partículas víricas³⁷.

La expresión de la región tardía del genoma de HPV se manifiesta histológicamente por cambios degenerativos en las células escamosas diferenciadas. La alteración celular más representativa de la infección productiva es la coilocitosis, descrita por primera vez por Koss y Durfee en 1956²⁸, caracterizada por vacualización citoplásmica perinuclear y picnosis o hiperchromatosis nuclear. Este fenómeno parece estar relacionado con la expresión de la proteína viral E4, que desorganiza la matriz intracelular de citoqueratinas para facilitar la liberación de partículas víricas¹²¹. Otras alteraciones histológicas incluyen paraqueratosis e hiperqueratosis, papilomatosis, binucleación, anisonucleosis y cromatina con aspecto de vidrio esmerilado¹¹⁸. El resultado histológico final suele ser lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL, de la terminología inglesa "low-grade squamous intraepithelial lesion"), que en un porcentaje mayoritario persisten o regresan, dependiendo de la respuesta inmune del paciente, y muy raras veces progresan hacia lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL, de la terminología inglesa "high-grade squamous intraepithelial lesion") y carcinomas invasivos¹¹⁷.

1.2.5.3. Infección no productiva.

La infección no productiva presenta tres características principales:

1. Expresión incompleta del genoma vírico.
2. No producción de nuevos viriones.

3. Integración del ADN vírico en el genoma de la célula infectada, en la mayoría de los casos¹²².

Hasta el momento no se ha descrito ningún sitio específico de integración del ADN de HPV en el ADN celular. Por el contrario, el genoma vírico sí presenta una región específica en la que se produce la apertura de la molécula circular de ADN en el proceso de integración. Concretamente ésta tiene lugar en el extremo 3' del ORF E1 o en el extremo 5' del ORF E2, lo que determina la pérdida de las funciones de transactivación y regulación de la transcripción codificada por el ORF E2^{82,83,87,89,123-126}. Esto implica la no expresión de la región tardía y la sobreexpresión de los dominios E6 y E7, con capacidad potencial transformante. Todo esto se traduce histológicamente en la proliferación de las células infectadas con pérdida de la maduración, dando lugar a HSIL, caracterizadas por la presencia de células inmaduras con signos de atipia nuclear ocupando más de un tercio del grosor del epitelio^{96,117,118}. Estas lesiones, dependiendo de varios cofactores y de la respuesta inmune del paciente, pueden persistir, regresar o, en un porcentaje elevado de casos, progresar a carcinoma invasivo¹¹⁷.

1.3. LESIONES GENITALES ASOCIADAS A HPV.

El desarrollo de las técnicas de biología molecular ha puesto de manifiesto la asociación de HPV con un amplio espectro de manifestaciones clínicas en el tracto genital femenino inferior, que abarcan desde lesiones benignas (condilomas)^{44,119,127-133} hasta lesiones malignas (carcinomas)^{97,113,128,134-149}, pasando por un abanico de lesiones no invasivas con potencialidad de evolución maligna^{44,109,136,149-161}. La terminología clásica separa éstas últimas en dos grupos¹⁶²⁻¹⁶⁴: displasia y carcinoma in situ (CIS). Posteriormente, han surgido otras dos terminologías para las lesiones no invasivas: neoplasia intraepitelial¹⁶⁵ y lesión intraepitelial escamosa^{166,167}. A continuación se desarrollan brevemente estas tres clasificaciones, así como las características histopatológicas de las distintas lesiones genitales asociadas a HPV, con especial atención a las lesiones

de cérvix, por ser éstas las más estudiadas y las más representativas.

I.3.1. CONDILOMA.

El condiloma es la manifestación más frecuente de la infección genital por HPV. Consiste en una lesión hiperplásica benigna cuyo aspecto macroscópico varía, dependiendo fundamentalmente del tipo y localización del epitelio infectado y del tipo de HPV que produce la infección. Así, en epitelio cutáneo (vulva y región perianal) el condiloma típico es una lesión exofítica, de aspecto polipoide, que suele estar queratinizada, y que se denomina condiloma acuminado (fig. I.4); en epitelio mucoso (vagina y cérvix), por el contrario, los condilomas más frecuentes tienen aspecto plano, un poco sobreelevados, formando placas irregulares con una superficie ligeramente ondulada o espiculada, normalmente poco queratinizados, y se denominan condilomas planos¹¹⁷. En muchas ocasiones éste último tipo de lesión sólo es visible mediante colposcopia, tras aplicación de ácido acético al 5%, con lo que adquieren un color blanquecino (fig. I.5).



Figura I.4. Condilomas acuminados múltiples en vulva y región perineal.

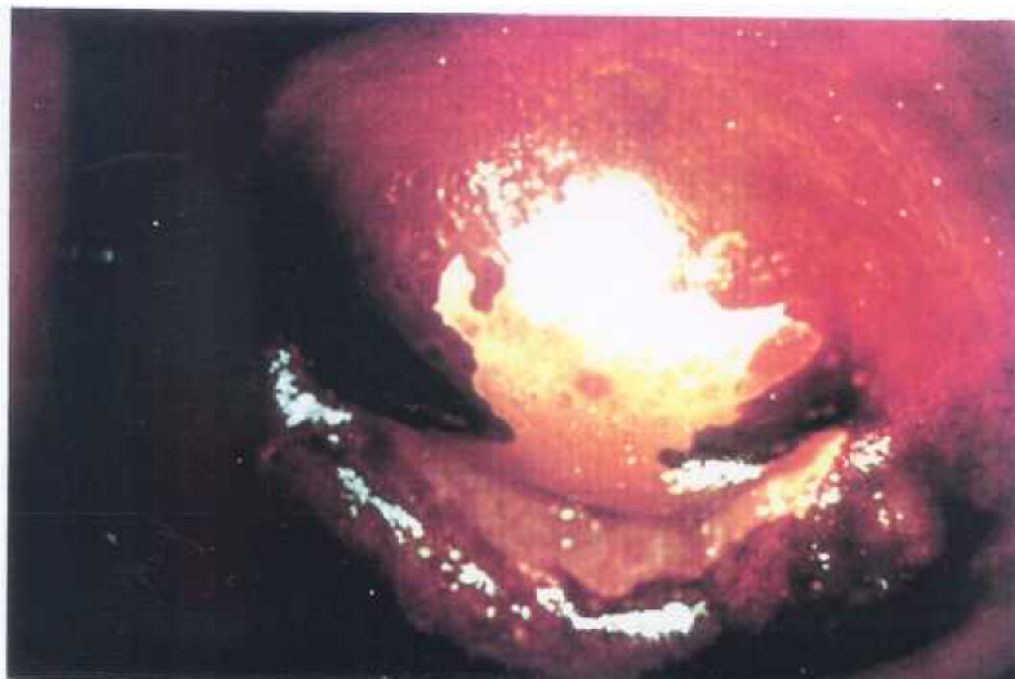


Figura 1.5. Imagen colposcópica de cérvix en la que se observa un área blanquecina de límites irregulares tras la aplicación de ácido acético al 5%.

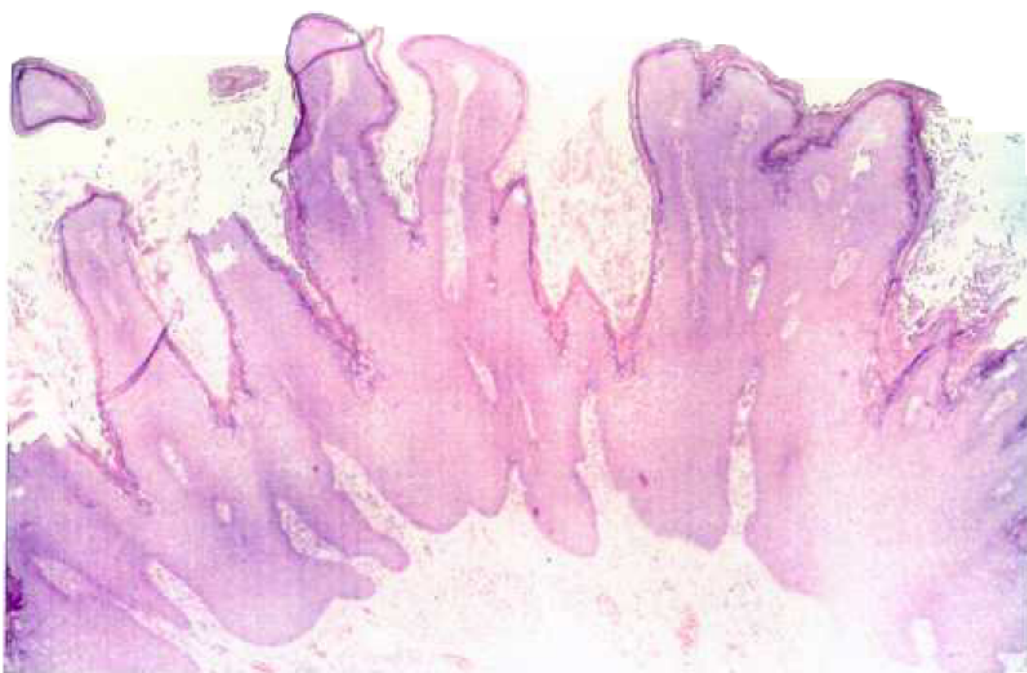


Figura 1.6. Microfotografía correspondiente a un condiloma acuminado de vulva, en la que se aprecian las alteraciones características de esta lesión. (Hematoxilina-eosina, x 40).

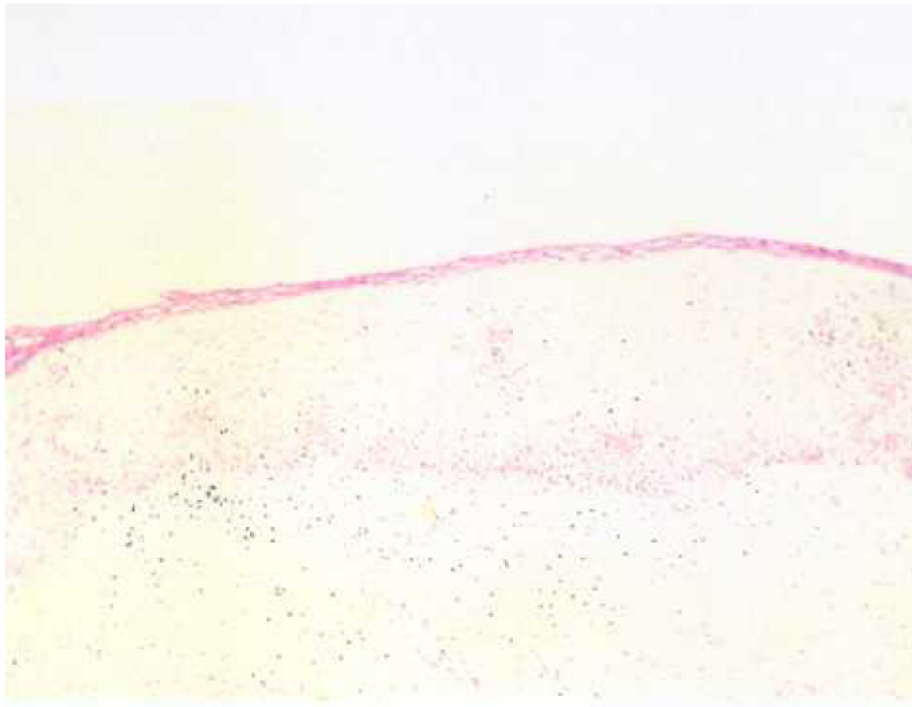


Figura I.7. Condiloma plano de cérvix. (Hematoxilina-eosina, x 100).

Histológicamente, los condilomas presentan las siguientes características^{34,35,117} (figs. I.6 y I.7):

- Papilomatosis.
- Acantosis.
- Paraqueratosis e hiperqueratosis.
- Hiperplasia de células basales.
- Coilocitosis.
- Binucleación.
- Anisonucleosis, picnosis e hipercromatismo nuclear.

- Núcleos con aspecto de vidrio esmerilado.
- Figuras de mitosis en el tercio inferior del epitelio.

I.3.2. LESIONES NO INVASIVAS CON POTENCIALIDAD DE EVOLUCION MALIGNA.

I.3.2.1. Terminología clásica.

La terminología clásica, se basa en criterios puramente histológicos, sin tener en cuenta ninguna consideración clínica ni terapéutica, y separa las lesiones no invasivas en dos grupos: displasia y carcinoma *in situ*.

Las lesiones displásicas fueron caracterizadas por Reagan en 1953¹⁶² como la proliferación de células atípicas sin ocupar el grosor entero del epitelio. Estas células atípicas son habitualmente células basales indiferenciadas que maduran cerca de la superficie.

En 1961, en el 1^{er} Congreso Internacional de Citología Exfoliativa, el Comité de Terminología Histológica para Lesiones de Cérvix Uterino¹⁶⁴ definió el carcinoma *in situ* como una lesión en la que, en ausencia de invasión, el grosor entero del epitelio está ocupado por células indiferenciadas. Cualquier otra alteración de la diferenciación del epitelio escamoso se definió como displasia.

Histológicamente, las lesiones displásicas presentan atipia nuclear, caracterizada por:

- Hiperchromatismo.
- Bordes nucleares irregulares.

- Distribución anormal de la cromatina.
- Cromatina granular (en forma de sal y pimienta).
- Incremento de la relación núcleo/citoplasma.
- Aumento de la actividad mitótica con algunas mitosis atípicas.

Las alteraciones nucleares se encuentran en todas las capas del epitelio, independientemente del grado de maduración citoplásmica.

La gradación de las lesiones displásicas se basa en la proporción de epitelio ocupado por células indiferenciadas, lo que refleja una pérdida progresiva de maduración epitelial a medida que aumenta la severidad de la lesión. Se distinguen tres grados de displasia:

1. **Displasia leve:** las células indiferenciadas ocupan el tercio inferior del epitelio (fig. I.8).
2. **Displasia moderada:** la proliferación de células indiferenciadas se extiende entre el tercio inferior y el tercio medio del epitelio, sin sobrepasar éste último (fig. I.9).
3. **Displasia severa:** las células indiferenciadas ocupan más de dos tercios del epitelio, sin llegar a ocupar el grosor entero del mismo (fig. I.10).

Cuando todo el espesor del epitelio está ocupado por células indiferenciadas semejantes a las basales y con alto grado de atipia, la lesión se diagnostica de carcinoma *in situ* (fig. I.11).

Esta terminología se usa tanto en lesiones de cérvix como en lesiones de vulva y vagina y ha sido adoptada por la Organización Mundial de la Salud¹⁶³.

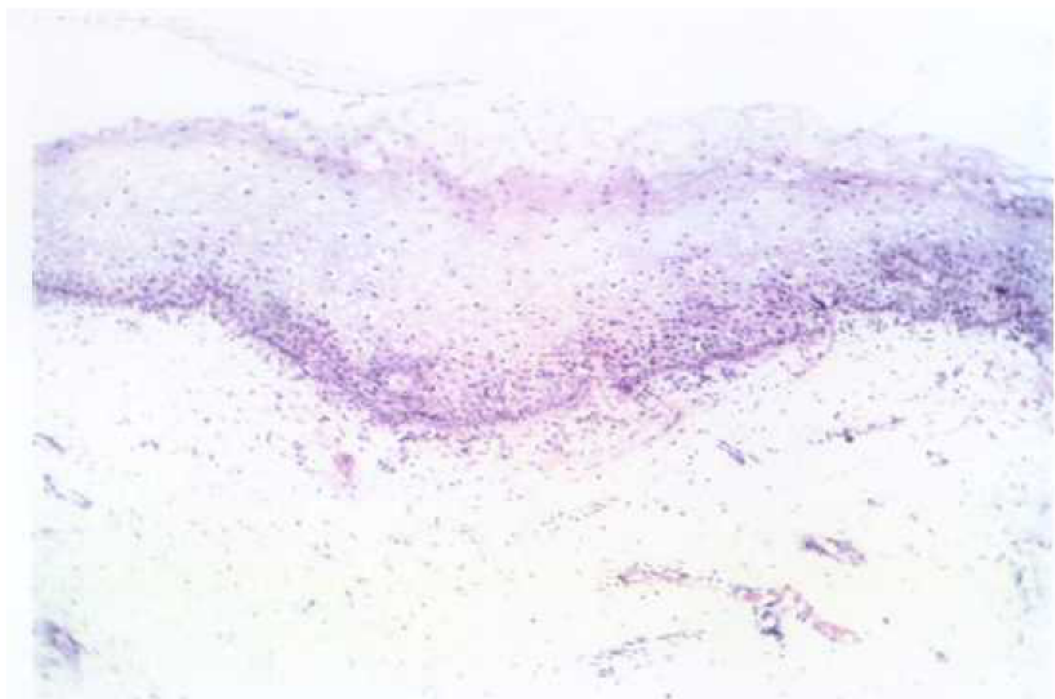


Figura I.8. Biopsia cervical diagnosticada de LSIL (displasia leve/CIN I) compatible con infección por HPV. (Hematoxilina-eosina, x 100).

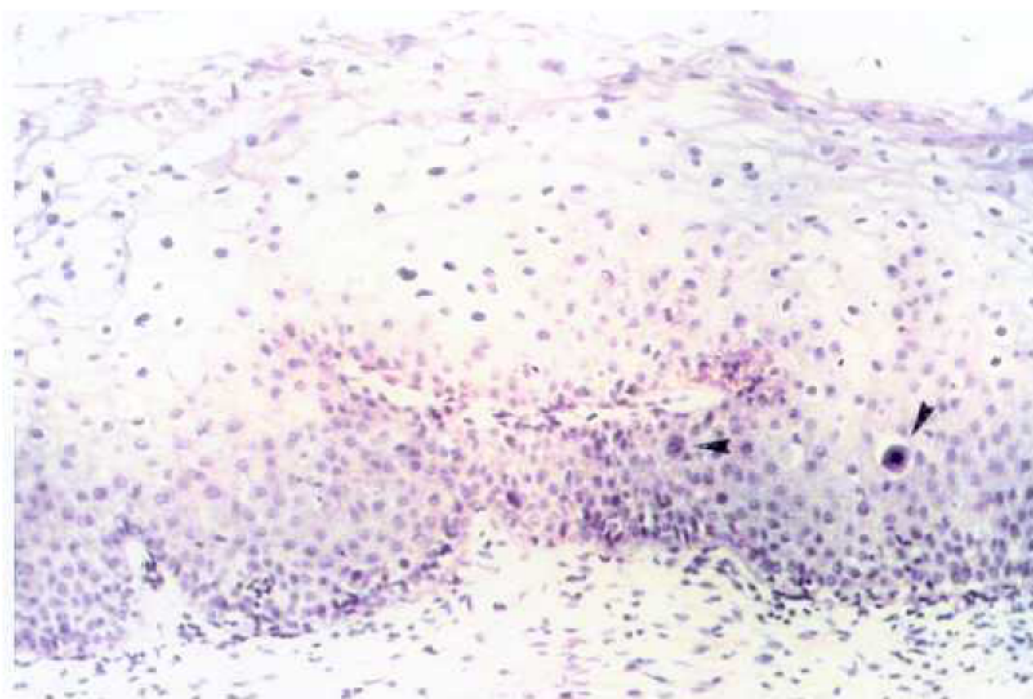


Figura I.9. Biopsia cervical diagnosticada de HSIL (displasia moderada/CIN II) compatible con infección por HPV, en la que se aprecia proliferación de la capa basal, que alcanza el tercio medio del epitelio, y atipia celular en estratos profundos (flechas). (Hematoxilina-eosina, x 200).

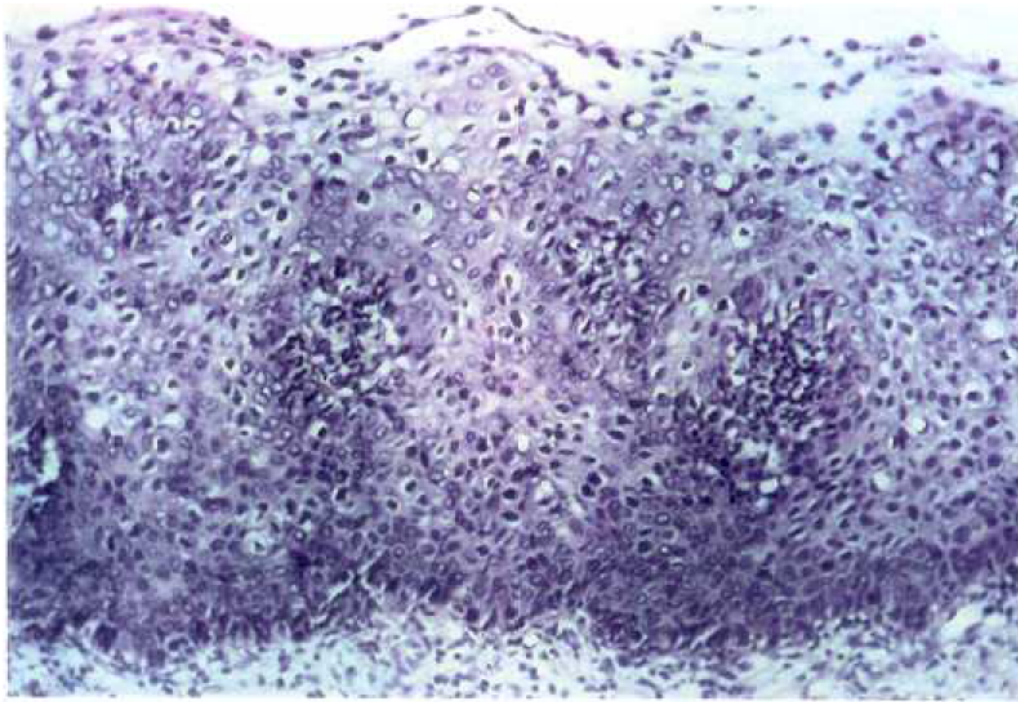


Figura I.10. Mucosa cervical con diagnóstico de HSIL (displasia severa/CIN III) con alteraciones en la maduración del epitelio, atipia celular y elevado índice mitótico. (Hematoxilina-eosina, x 200).

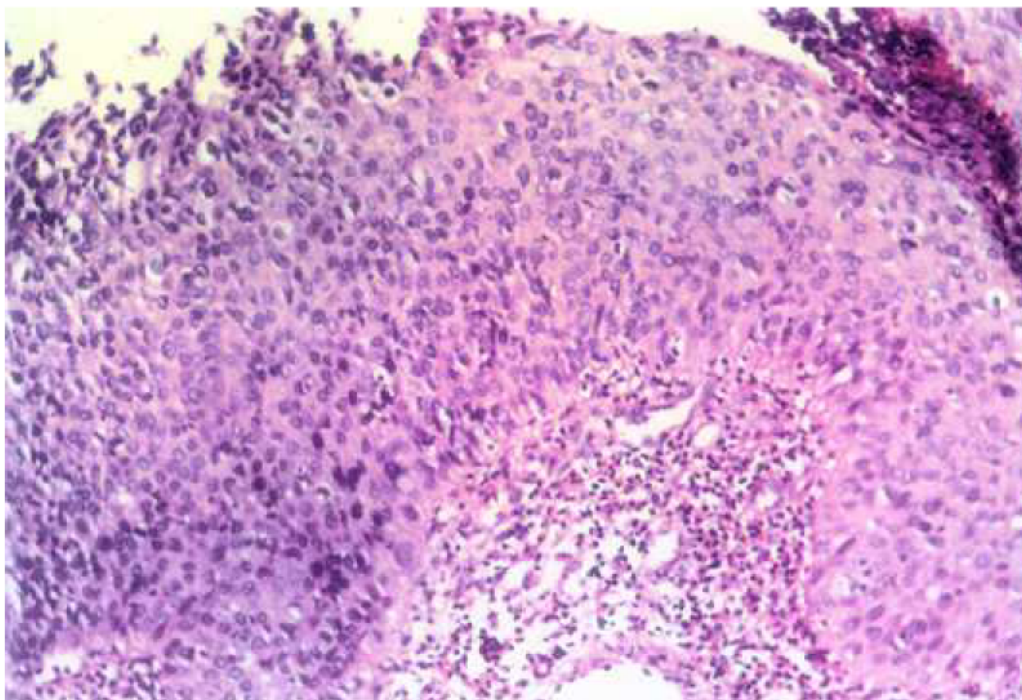


Figura I.11. Biopsia de cérvix uterino diagnosticada de HSIL (CIN III/Carcinoma *in situ*) con alto grado de atipia celular en todas las capas del epitelio, permaneciendo intacta la membrana basal. (Hematoxilina-eosina, x 200).

I.3.2.2. Clasificación CIN.

A finales de los años 60, y de la observación en lesiones displásicas de cérvix uterino de toda una gradación en la diferenciación y maduración celular, surgió la idea de que todas estas lesiones eran distintas manifestaciones de un único proceso patológico, que se denominó neoplasia intraepitelial cervical^{165,168} (CIN, de la terminología inglesa "cervical intraepithelial neoplasia").

El uso de este término, aplicado a una lesión, implica una potencialidad de evolución maligna, es decir, que esa lesión, si no se trata, tiene una probabilidad significativa de progresar a carcinoma invasivo en algún momento en el futuro^{169,170}.

Las características histológicas y colposcópicas del CIN son las mismas que las de la displasia y, como ésta, se subdivide en tres grados dependiendo también del grosor del epitelio ocupado por células indiferenciadas semejantes a las basales:

1. **CIN I**, equivalente a la displasia leve (fig. I.8).
2. **CIN II**, equivalente a la displasia moderada (fig. I.9).
3. **CIN III**, que elimina la distinción morfológica entre displasia severa y carcinoma *in situ*, sin ninguna significación clínica, y las agrupa en una sola categoría (figs. I.10 y I.11) (tabla I.III).

Este mismo sistema de clasificación se aplica también a las lesiones premalignas no invasivas de vulva (VIN, de la terminología inglesa "vulvar intraepithelial neoplasia") y de vagina (VaIN, de la terminología inglesa "vaginal intraepithelial neoplasia")⁹⁶.

SISTEMA CLASICO	SISTEMA CIN	SISTEMA DE BETHESDA
displasia leve	CIN I	LSIL
displasia moderada	CIN II	HSIL
displasia severa	CIN III	
carcinoma in situ		

Tabla I.III. Equivalencias entre las distintas clasificaciones de las lesiones de cérvix uterino con potencialidad de evolución maligna.

I.3.2.3. Sistema de Bethesda.

En 1988, en una reunión en el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos, en Bethesda, se propuso una nueva terminología para las lesiones cervicales diagnosticadas mediante citología exfoliativa¹⁶⁶, que fue modificada en 1991¹⁶⁷.

Según este sistema, las citologías que muestran cambios asociados a HPV (coilocitosis y anisocitosis), así como las formas de displasia leve, se clasifican como lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL). Las formas de displasia moderada, displasia severa y CIS se clasifican como lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL).

Aunque esta clasificación fue diseñada en principio para informes citológicos, se ha extendido también a los informes histopatológicos^{96,171}, manteniendo las correspondencias con las otras clasificaciones (tabla I.III).

La aplicación del sistema de Bethesda al diagnóstico histopatológico de

biopsias cervicales se basa en criterios de distribución de la atipia celular más que en criterios de maduración, en los que se basan el sistema clásico y el sistema CIN⁹⁶. Conviene interpretar estas lesiones como el resultado de la interacción virus-huésped, que origina una transformación morfológica del epitelio. En las LSIL este proceso produce una lesión en la que las principales anormalidades citológicas se observan en la superficie del epitelio y se caracterizan por coilocitosis, disqueratosis, anisonucleosis e hiperchromatismo nuclear⁹⁶ (figs. I.7 y I.8). Por lo tanto, en esta categoría se engloban los condilomas acuminado y plano y el CIN I/displasia leve. En las HSIL la alteración del epitelio es mayor y se caracteriza por atipia nuclear que afecta a casi todas o todas las capas celulares de por lo menos una porción de la lesión. Concretamente, se observa un alto índice mitótico, con mitosis incluso en capas celulares superficiales y figuras de mitosis anormales, pérdida de la polaridad celular, anisonucleosis e hiperchromatismo nuclear en capas de células parabasales⁹⁶ (figs. I.9, I.10 y I.11). En esta categoría se engloban el CIN II/displasia moderada y el CIN III/displasia severa-carcinoma *in situ*.

Dos son las ventajas que presenta este sistema de clasificación sobre los anteriores:

1. La agrupación de las lesiones cervicales en dos categorías, LSIL y HSIL, tiene una mayor significación cuando se consideran criterios terapéuticos.
2. La agrupación de CIN II (displasia moderada) y CIN III (displasia severa y CIS) en una única categoría, ya que, si bien hay diferencia histológica entre ambos grados de CIN, la diferencia es muy pequeña cuando se evalúan parámetros virales o de contenido de ADN celular^{136,157,169,172-174}.

El principal problema de este sistema es determinar el límite entre LSIL y HSIL. Sin embargo, este problema se plantea en todas las clasificaciones cuando hay que determinar los límites entre cada grado histológico de una lesión

(displasia o CIN). Además, a nivel de tratamiento, la importancia de diagnosticar una lesión dudosa como LSIL o HSIL se reduce teniendo en cuenta que los resultados anatomopatológicos deben completarse siempre con parámetros clínicos y colposcópicos.

Hasta el momento actual, la clasificación de Bethesda se aplica sólo a lesiones cervicales, manteniéndose la terminología de neoplasia intraepitelial para las lesiones vulvares y vaginales (VIN y VaIN, respectivamente).

I.3.3. LESIONES INVASIVAS.

Varios tipos de carcinoma genital se han asociado con la presencia de ADN de HPV, principalmente de los tipos 16 y 18, incluyendo carcinomas escamosos de cérvix, carcinomas verrucosos, carcinomas de células pequeñas y adenocarcinomas de cérvix.

I.3.3.1. Carcinoma escamoso de cérvix.

La mayoría de los carcinomas escamosos de cérvix evolucionan desde una lesión precancerosa (HSIL)¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ y se localizan mayoritariamente en la zona de transformación. Su apariencia macroscópica depende fundamentalmente del tiempo de evolución. Las lesiones tempranas pueden producir induración focal, ulceraciones poco profundas o áreas granulares ligeramente sobreelevadas que sangran fácilmente al tocarlas. Las lesiones más avanzadas pueden tener apariencia endofítica (ulceroinvasiva o nóduloinvasiva) o exofítica (polipoide o papilar).

Microscópicamente se caracterizan por cordones o masas sólidas de epitelio neoplásico, de contorno irregular, que infiltran el estroma fibroso del cérvix. La clasificación histológica más ampliamente aceptada es una modificación

del sistema de Broder y se basa en el grado de diferenciación de las células neoplásicas^{178,179}.

1. **Carcinoma escamoso bien diferenciado.** Su característica más relevante es la abundante formación de queratina, que se deposita en círculos concéntricos en el centro de las masas epiteliales neoplásicas, formando los llamados globos córneos (Fig. I.12).

Las células aparecen maduras, con citoplasmas voluminosos y eosinófilos. A veces presentan un aspecto claro por la acumulación de glucógeno intracitoplásmico. Los núcleos son grandes, irregulares o hipercromáticos, con nucleolos aumentados en número y tamaño. Se observan mitosis, sobre todo en la periferia de las masas epiteliales en crecimiento. En el estroma a menudo se observa un infiltrado de células inflamatorias crónicas y a veces se observan también reacciones de cuerpo extraño.

2. **Carcinoma escamoso moderadamente diferenciado.** Las células son más pleomórficas que en el caso anterior y se caracterizan por tener núcleos grandes irregulares y citoplasma menos abundante. Prácticamente no hay formación de globos córneos, pero en el centro de las masas tumorales se observa disqueratosis (Fig. I.13). Las figuras de mitosis son más numerosas que en el carcinoma bien diferenciado.

3. **Carcinoma escamoso pobremente diferenciado.** Generalmente está constituido por células con núcleos ovales hipercromáticos y citoplasma escaso, recordando las células basales de las HSIL (Fig. I.14). Se observan escasos focos de disqueratosis y abundantes mitosis y zonas de necrosis. A veces, este tipo de carcinomas está compuesto por células pleomórficas grandes, de núcleos gigantes, observándose mitosis anormales. En raras ocasiones las células neoplásicas tienen forma fusiforme, recordando un sarcoma.

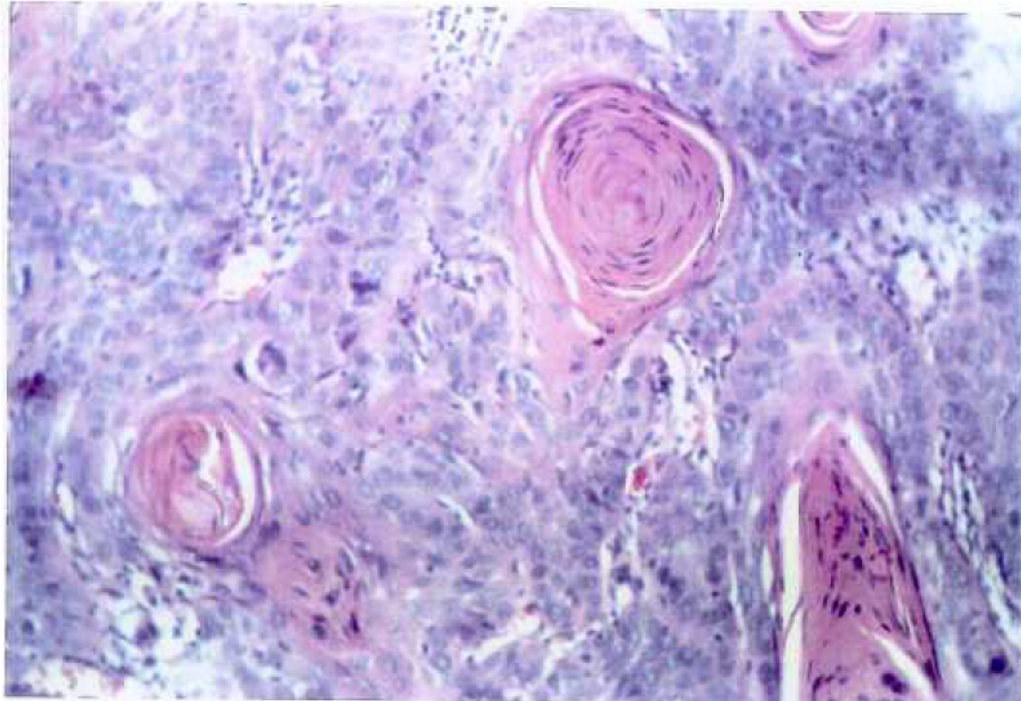


Figura I.12. Carcinoma escamoso de cérvix bien diferenciado. Obsérvese la formación de globos córneos (flechas). (Hematoxilina-eosina, x 200).

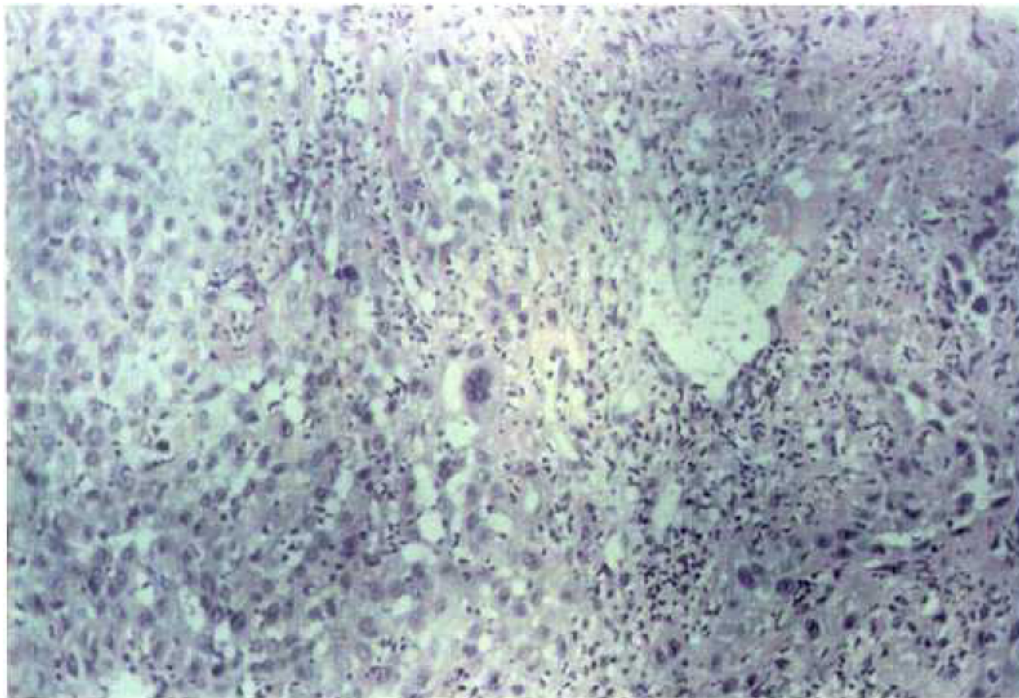


Figura I.13. Carcinoma escamoso de cérvix moderadamente diferenciado. (Hematoxilina-eosina, x 200).

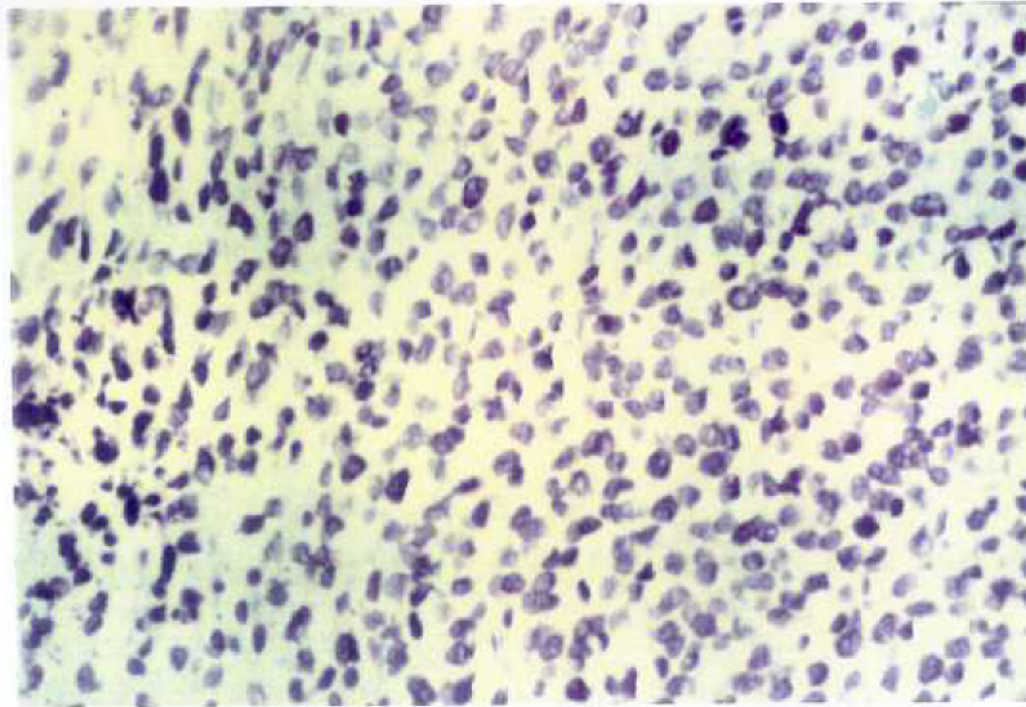


Figura I.14. Carcinoma indiferenciado de cérvix. (Hematoxilín-eosina, x 320).

I.3.3.2. Carcinoma verrucoso.

El carcinoma verrucoso se puede considerar una variante rara del carcinoma escamoso bien diferenciado. Se observan más comúnmente en vulva que en cérvix^{180,181}. Macroscópicamente son lesiones grandes, sésiles, que recuerdan a los condilomas. Histológicamente consisten en epitelio de apariencia hiperplásica, con proyecciones papilares sin núcleo central fibrovascular y con cordones de células escamosas bien diferenciadas que se expanden en el estroma subyacente (fig. I.15). El extremo de estos cordones de invasión puede ser romo o anguloso y carece de atipia nuclear significativa, aunque en algunos casos se pueden observar numerosas mitosis. Normalmente, un intenso infiltrado inflamatorio se asocia a este tipo de carcinoma, aun sin ser específico de él.

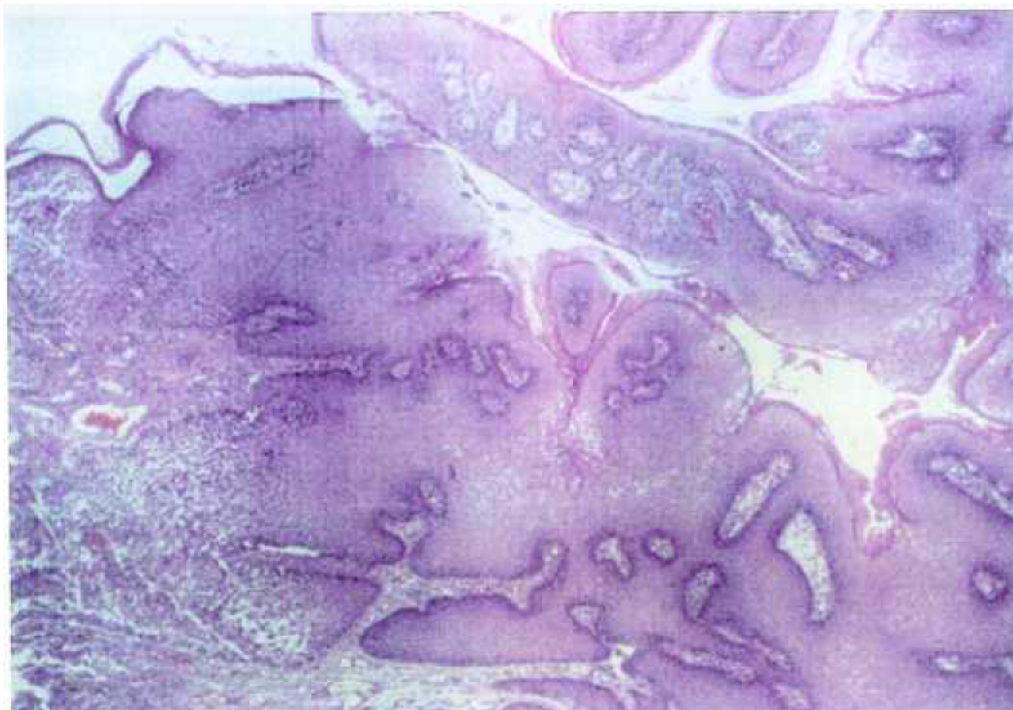


Figura I.15. Carcinoma verrucoso de vulva. (Hematoxilina-eosina, x 40).

I.3.3.3. Carcinoma de células pequeñas.

Está constituido por células pequeñas y uniformes, que forman agregados de forma irregular con poca cohesión y amoldamiento nuclear. Suelen infiltrar extensamente el estroma subyacente. Esta neoplasia se caracteriza por la presencia de invasión vascular y la carencia de respuesta inflamatoria¹⁸². Frecuentemente se asocian con producción de hormonas peptídicas¹⁸².

I.3.3.4. Adenocarcinoma de cérvix.

En un examen macroscópico, el 50% de los pacientes con un adenocarcinoma cervical presentan masas papilares o polipoides, mientras que aproximadamente en un 15% de pacientes no se observa lesión, porque el adenocarcinoma se localiza internamente en el canal endocervical¹⁷⁸. Histológicamente hay muchas variaciones en el tipo celular y en la forma de

crecimiento. Los más frecuentes son los de tipo endocervical, que se originan en el endocérnix y son bien o moderadamente diferenciados. Están constituidos por células columnares endocervicales conteniendo mucina intracelular, que se ordenan según una estructura glandular compleja en forma de racimos, que reproducen la configuración de la mucosa endocervical normal^{178,183} (Fig. I.16).

I.3.4. TIPOS DE HPV ASOCIADOS CON DIFERENTES LESIONES.

A partir de numerosos estudios con técnicas de biología molecular (Southern blot, Reverse blot, Dot blot, Hibridación *in situ*), se ha observado una asociación específica de algunos tipos de HPV con ciertas lesiones^{106,112,113,127,134-139,150-156,184-199}, lo que sugiere que distintos tipos de HPV tienen diferente potencial oncogénico. Todo ello ha conducido a agrupar los HPV genitales en tres categorías o grupos de riesgo con respecto a la carcinogénesis:

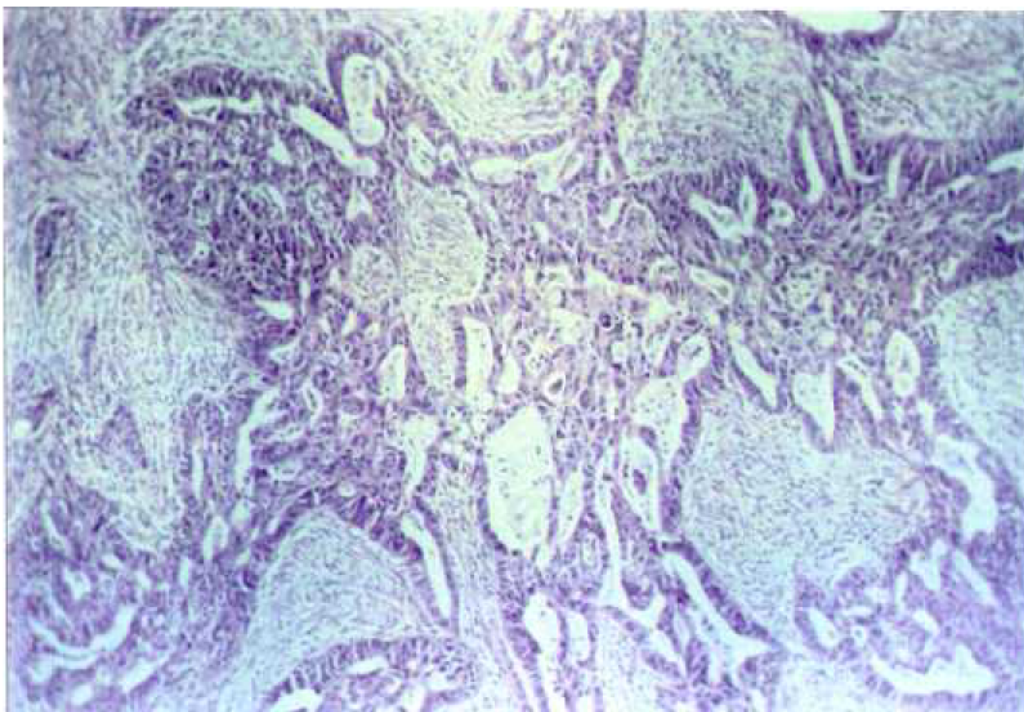


Figura I.16. Adenocarcinoma bien diferenciado de cérvix. (Hematoxilina-eosina, x 100).

1. **HPV genitales de bajo riesgo**, entre los que se encuentran los tipos 6, 11, 42, 43 y 44 (los más representativos son los tipos 6 y 11).

Estos tipos de HPV se asocian predominantemente a lesiones benignas (condiloma acuminado y LSIL), fruto de infecciones productivas. Sin embargo, no hay que confundir "bajo riesgo" con "ausencia de riesgo". De hecho se han identificado los tipos 6 y 11 de HPV en algunas lesiones malignas^{135,137,185,200-203}. El estudio de estos casos poco frecuentes sugiere que una alteración específica en la región URR del genoma vírico puede alterar virus habitualmente no oncogénicos de manera tal que produzcan una neoplasia invasiva²⁰⁰⁻²⁰³.

2. **HPV genitales de alto riesgo**, entre los que se encuentran los tipos 16, 18, 45 y 56 (los más representativos son los tipos 16 y 18).

Estos tipos virales se detectan en mayor proporción en HSIL y lesiones invasivas, como consecuencia de infecciones no productivas.

HPV 16 es el tipo que se encuentra con mayor frecuencia en carcinomas de células escamosas²⁰⁴, mientras que HPV 18 es el tipo más frecuente en adenocarcinomas^{97,205-207} y en carcinomas de células pequeñas⁹⁹.

A diferencia de HPV 16, que se detecta en proporciones similares en HSIL y lesiones invasivas, HPV 18 se detecta más en lesiones invasivas que en HSIL^{118,189}. Para explicar este hecho algunos autores sugieren que HPV 18 tiene mayor potencial oncogénico que otros tipos virales de alto riesgo, por lo que las lesiones producidas por este tipo progresarían más rápidamente^{184,189} y por ello podrían tener peor pronóstico.

Tipos de HPV de alto riesgo se han encontrado también, aunque en proporción mucho menor, en LSIL e, incluso, en epitelios

histológicamente normales, produciendo infecciones latentes de pronóstico desconocido^{106,110,111,154}.

3. **HPV genitales de riesgo intermedio**, entre los que se encuentran los tipos 31, 33, 35, 39, 51, 52 y 58 (los más representativos son los tipos 31 y 33).

Estos tipos virales se encuentran en proporciones similares en LSIL y HSIL, y en un porcentaje ligeramente inferior en carcinomas invasivos^{118,136,174,189}. Algunos autores hipotetizan que las lesiones producidas por estos tipos de HPV evolucionan muy lentamente en un sentido u otro (progresión o regresión), jugando un papel muy importante la respuesta inmune de la persona infectada^{207,208}.

I.4. DIAGNOSTICO DE LA INFECCION GENITAL POR HPV.

La imposibilidad de cultivar el HPV *in vitro*, ha determinado que el diagnóstico de esta infección se realice aplicando una serie de técnicas que van desde la mera observación clínica de las lesiones producidas por el virus hasta la amplificación de secuencias génicas específicas de los distintos tipos virales, pasando por la detección anatomopatológica de las alteraciones celulares producidas por el virus, la observación por microscopía electrónica de las partículas víricas, la detección de antígenos víricos por métodos inmunológicos y la detección de secuencias de ácidos nucleicos específicas de HPV por técnicas de hibridación molecular (tabla I.IV).

A continuación se desarrollan brevemente las distintas técnicas de diagnóstico, con especial énfasis en la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ*, por ser las técnicas empleadas en el presente estudio.

OBSERVACION CLINICA DE LESIONES	HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS
<ul style="list-style-type: none"> Observación directa. Tinciones. Colposcopia. 	<ul style="list-style-type: none"> Southern blot. Dot blot. Reverse blot. Técnica sandwich. Hibridación in situ <ul style="list-style-type: none"> - En tejido - En filtro
CITOLOGIA/HISTOLOGIA	AMPLIFICACION DE DNA
<ul style="list-style-type: none"> Citología cérvico-vaginal Biopsia genital. 	<ul style="list-style-type: none"> PCR PCR in situ
MICROSCOPIA ELECTRONICA	
TECNICAS INMUNOLOGICAS	
<ul style="list-style-type: none"> ELISA. Western blot. Inmunohistoquímica. 	

Tabla I.IV. Técnicas utilizadas en el diagnóstico de la infección genital por HPV.

I.4.1. OBSERVACION CLINICA DE LAS LESIONES.

I.4.1.1. Observación directa.

La observación directa del tracto genital femenino inferior únicamente permite detectar la presencia de lesiones exofíticas de tipo verrucoso o polipoide, siendo imposible en muchas ocasiones hacer el diagnóstico diferencial entre un condiloma acuminado (lesión producida por HPV) y un pólipo (lesión no producida por HPV). A nivel de cérvix uterino la observación directa no permite distinguir en la mayoría de las ocasiones un epitelio displásico de uno normal.

Con el fin de obtener mayor información se han desarrollado métodos de tinción, de los que el más usado es el test de Schiller^{117,208}. Se basa en que al aplicar una solución diluida de yodo en un exocérvis normal, toda la mucosa se tiñe de un color marrón caoba oscuro, por la presencia de glucógeno intracelular. Las áreas con apariencia clínica normal que no se tiñen pueden corresponder a zonas de epitelio displásico, desprovisto de glucógeno (fig I.17). Sin embargo,

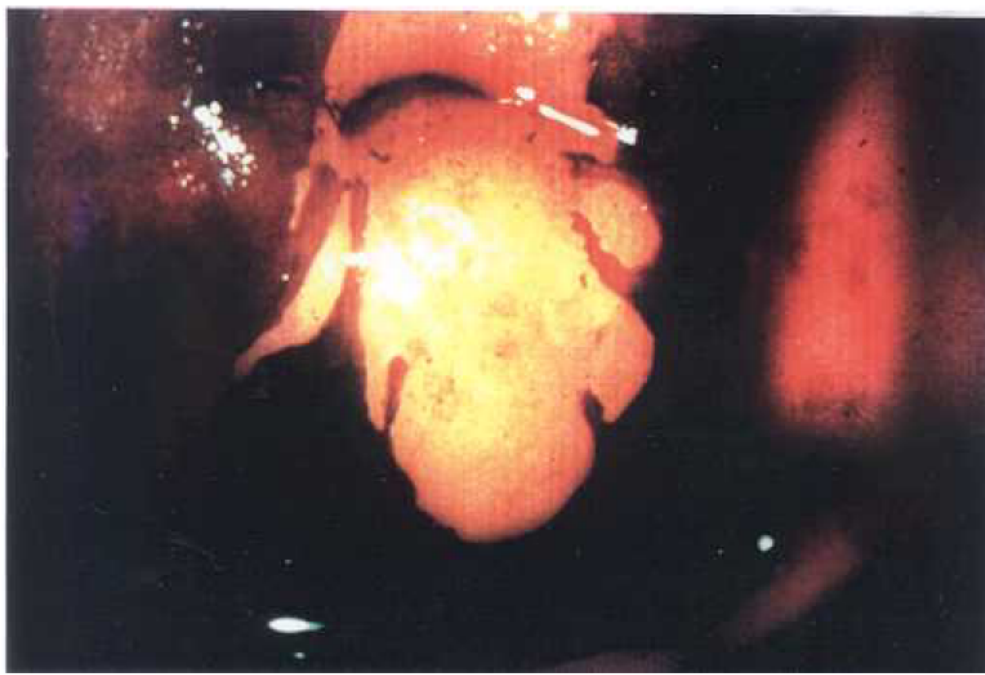


Figura I.17. Imagen colposcópica de cérvix uterino en la que se observa un área negativa con la tinción de yodo.

este test no es bueno para diagnosticar la infección por HPV ya que hay lesiones yodo negativas que no son producidas por HPV (epitelio metaplásico y reacciones inflamatorias) y viceversa, lesiones displásicas producidas por HPV que son yodo positivas²⁰⁸.

I.4.1.2. Colposcopia.

La colposcopia consiste en la observación del cérvix uterino mediante el colposcopio, instrumento óptico de amplificación, binocular y estereoscópico, que permite obtener imágenes tridimensionales de los tejidos superficiales. De esta manera se pueden visualizar las modificaciones morfológicas del epitelio que acompañan a la infección por HPV.

El diagnóstico colposcópico se basa en la evaluación de varios parámetros: el tono de color (rosa, blanco, etc.) y opacidad de la mucosa, el contorno de la

superficie (lisa, rugosa, espiculada, punteada, en forma de mosaico, etc.) y el patrón vascular del sistema capilar subepitelial.

El análisis colposcópico se completa con la aplicación de ácido acético al 4-5% sobre las mucosas en estudio (test de Hinselman), que elimina el moco y deshidrata las células. Las zonas con queratinización superficial anormal, hiperplasia o aumento de la densidad nuclear aparecen blancas^{100,117,209}.

Las alteraciones epiteliales que produce la infección por HPV determinan también anomalías en la red vascular subepitelial, dando lugar a patrones colposcópicos característicos. Las imágenes colposcópicas que se corresponden histológicamente con lesiones intraepiteliales escamosas consisten en lesiones de color blanco, visibles sólo después de la aplicación de ácido acético, con bordes definidos, y en las que o bien los capilares subendoteliales no son visibles, o bien aparece un punteado rojo o un patrón de tipo mosaico. En ocasiones se observan áreas blancas de superficie rugosa, visibles antes de la aplicación del ácido acético (leucoplasias), que normalmente corresponden a zonas de hiperqueratosis o paraqueratosis, pero que en ocasiones pueden también corresponder a lesiones intraepiteliales producidas por HPV^{117,208,209}.

Finalmente, algunas lesiones de alto grado y carcinomas invasivos pueden presentar también una apariencia colposcópica de vasos atípicos debido a capilares con zonas de dilatación y constricción y ramificaciones anómalas, e incluso se pueden observar lesiones exofíticas.

En resumen, la colposcopia permite observar lesiones compatibles con infección por HPV, aunque no permite saber el grado de la lesión ni el tipo de HPV que la origina. Por ello, lo indicado en estos casos es la toma de biopsias de la zona afectada para su posterior estudio.

El colposcopio se utiliza también para observar los tejidos de vulva (vulvoscopía) y vagina (vaginoscopia).

I.4.2. DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLOGICO.

I.4.2.1. Citología exfoliativa cérvico-vaginal.

La técnica anatomopatológica más usada para el diagnóstico de lesiones del tracto genital femenino inferior es la citología exfoliativa cérvico-vaginal de tres tomas teñida por el método de Papanicolau. Su amplia utilización como técnica rutinaria diagnóstica se basa en su probada efectividad para reducir el riesgo de cáncer cervical por la detección precoz de lesiones precursoras, unido a su bajo costo y a que la toma de la muestra es muy sencilla y poco agresiva. Se ha estimado que la mortalidad por cáncer cervical puede disminuir en un 70% mediante el estudio de una citología cada 3 años como media, dependiendo de las características de la población estudiada^{210,211}.

El diagnóstico citológico de la infección por HPV se basa en la observación de dos alteraciones celulares, principalmente a nivel de las células superficiales:

1. Coilocitosis:

El coilocito representa la alteración celular más característica producida por el virus. El núcleo de esta célula puede ser único o múltiple, de forma irregular e hipercromático. Presenta un halo perinuclear característico, a menudo irregular, y el citoplasma periférico tiene una densidad aumentada y presenta características tintoriales anfófilas^{34,35} (figs. I.18 y I.19).

2. Disqueratosis:

Consiste en la presencia de células queratinizadas en zonas del epitelio donde no debería haberlas. La célula disqueratósica típica presenta un núcleo pequeño, denso e hipercromático, de un tamaño



Figura I.18. Frotis vaginal diagnosticado de LSIL en el que se observa una célula coilocítica. (Tinción de Papanicolaou, x 640).



Figura I.19. Detalle de un coilocito binucleado en un frotis vaginal diagnosticado de LSIL. (Tinción de Papanicolaou, x 640).

similar al de una célula intermedia. El citoplasma es denso y se tiñe de color naranja o amarillento con la tinción de Papanicolau^{34,35,212}.

La observación conjunta de ambas alteraciones celulares es altamente sugestiva de infección por HPV, mientras que la observación de una sola de ellas es mucho menos específica.

Las características citológicas de LSIL incluyen, además de las dos anteriormente citadas, anisonucleosis e hiper cromatismo y, en ocasiones, paraqueratosis e hiperqueratosis (fig 1.20). Generalmente estas lesiones presentan una atipia nuclear mínima en las células de capas inferiores y muestran maduración superficial⁹⁶.

La separación citológica entre LSIL y HSIL viene determinada por dos factores: el aumento del número de células menos maduras y un incremento en la atipia nuclear en un alto porcentaje de células. Concretamente, los núcleos suelen ser mayores, de contornos irregulares y con distribución anormal de la cromatina⁹⁶ (fig. 1.21).

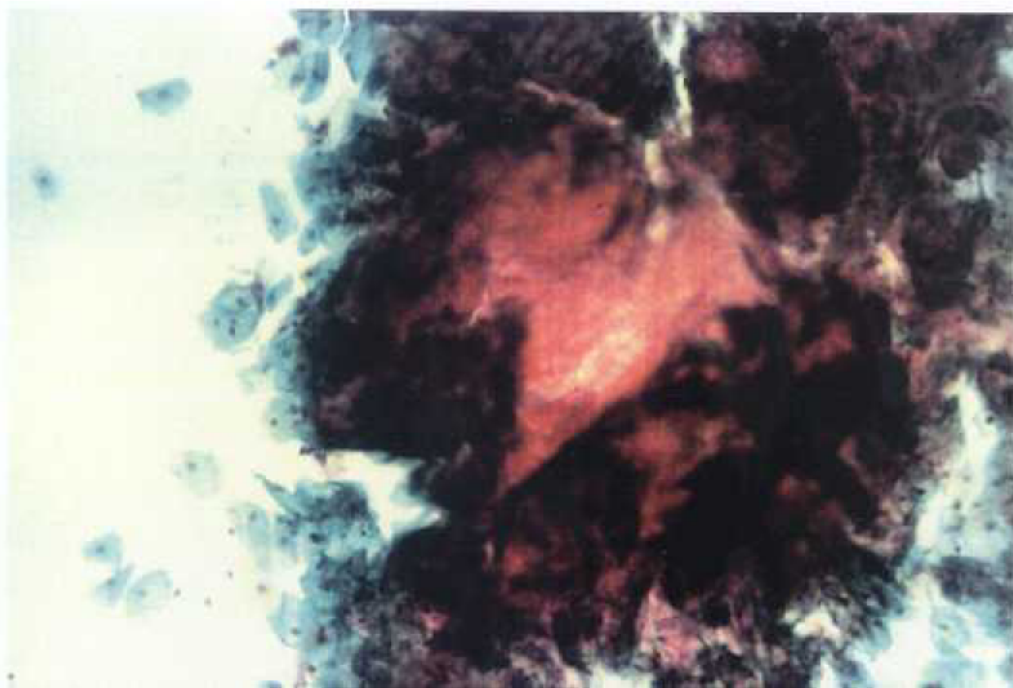


Figura 1.20. Placa de hiperqueratosis en un frotis vaginal diagnosticado de infección por HPV. (Tinción de Papanicolaou, x 160).

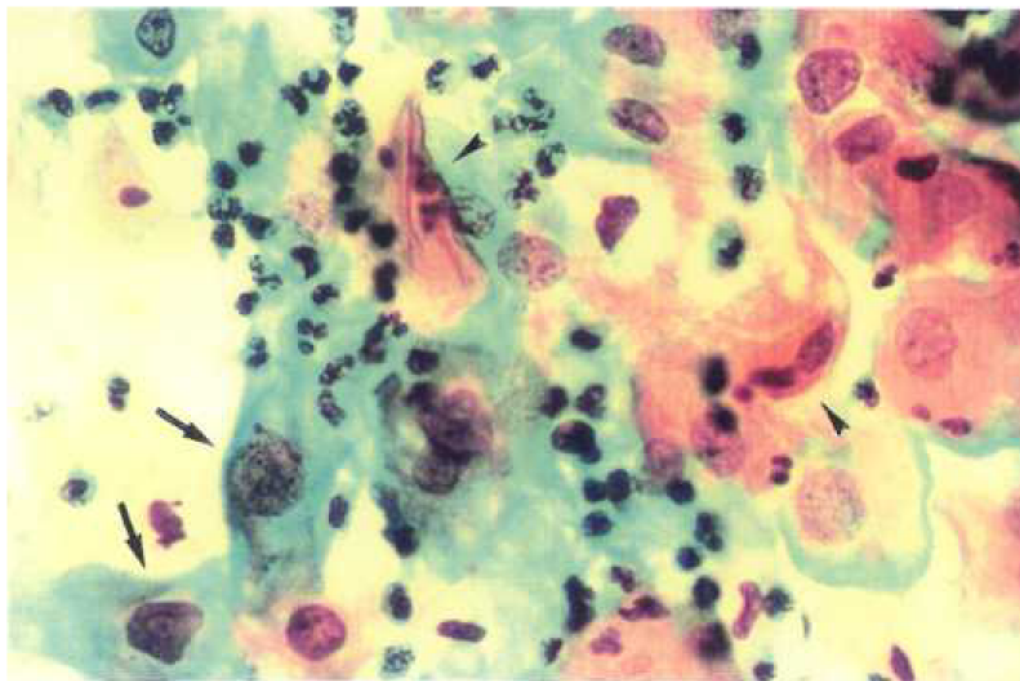


Figura 1.21. Frotis cérvico-vaginal diagnosticado de HSIL, en el que se aprecia displasia coilocítica (flecha larga) y paraqueratosis (flecha corta). (Tinción de Papanicolaou, x 640).

A pesar de las numerosas ventajas que la citología cérvico-vaginal tiene como técnica rutinaria para el diagnóstico precoz del cáncer, tiene también varios inconvenientes en lo que respecta al diagnóstico de la infección genital por HPV:

- Elevada proporción de falsos negativos. Algunos autores sitúan entre el 11 y el 23% el porcentaje de citologías positivas para SIL incorrectamente diagnosticadas como normales^{213,214}. Este porcentaje de falsos negativos es superior con respecto al diagnóstico de infección por HPV, ya que además es imposible detectar citológicamente las infecciones latentes (que no producen alteraciones celulares), y muchas lesiones de alto grado cursan sin coilocitosis, siendo diagnosticadas sólo de HSIL en lugar de HSIL compatible con infección por HPV.

- Imposibilidad de conocer el tipo de HPV causante de una lesión. Las lesiones producidas por los distintos tipos de HPV genitales son todas

citológicamente idénticas, por lo que no es posible saber el tipo de HPV presente en una lesión, a pesar de la importancia que esto tiene como factor pronóstico para intentar predecir su evolución.

I.4.2.2. Biopsia genital.

La toma de una biopsia genital para su estudio anatomopatológico está indicada siempre que se observe una lesión en una exploración colposcópica y cuando se obtenga un resultado citológico anormal, aunque la colposcopia sea normal, en cuyo caso conviene realizar cuatro biopsias cervicales en los cuatro puntos cardinales de la topografía exocervical.

Los criterios histológicos de LSIL y HSIL ya han sido señalados con anterioridad (página 28).

El diagnóstico de la infección por HPV no debe basarse exclusivamente en la presencia de coilocitosis, a pesar de que éste sea una alteración celular relativamente específica del virus. Esto es debido a que otras situaciones pueden producir también este efecto, como la degeneración vacuolar relacionada con atrofia en mujeres postmenopáusicas, la tricomoniasis, la candidiasis y la infección por *Gardnerella vaginalis*¹¹⁷. Así pues, la coilocitosis se considera un marcador de la infección por HPV sólo cuando se observan otras dos de las siguientes características histológicas¹¹⁸ (fig. I.22):

- Binucleación y multinucleación.
- Disqueratosis.
- Papilomatosis.
- Contorno nuclear irregular.

El estudio de una biopsia genital para el diagnóstico de la infección por HPV presenta los mismos inconvenientes que la citología cérvico-vaginal, puesto que tampoco permite detectar las infecciones latentes, en las que no hay alteración histológica, ni permite conocer el tipo de HPV presente en una lesión, puesto que las lesiones producidas por los distintos tipos virales son histológicamente iguales.

I.4.3. MICROSCOPIA ELECTRONICA.

El diagnóstico de la infección genital por HPV mediante microscopía electrónica se basa en la observación intranuclear de partículas víricas con un tamaño acorde con el del virión de HPV (50-55 nm).

A pesar de que la cápside es icosaédrica, los HPV tienen una apariencia esférica y suelen agruparse formando pseudocristales (fig. I.22).



Figura I.22. Microfotografía electrónica del núcleo de un coilocito con partículas víricas compatibles con HPV, tanto aisladas (flecha corta) como formando agrupaciones características (flecha larga). (x 44.000)

Se han observado partículas víricas en todos los tipos de lesiones asociados a HPV, pero siempre en coilocitos y células disqueratóicas^{46,215-223}. Sin embargo, esta técnica presenta grandes inconvenientes que no la hacen recomendable para el diagnóstico rutinario de esta infección:

- Baja sensibilidad. Cuando se la compara con criterios clínicos, citológicos e histológicos, la sensibilidad de la microscopía electrónica para detectar la infección por HPV oscila entre un 10 y un 50%, según los distintos autores y el tipo de lesiones estudiados^{46,215,219-222}, siendo máxima en LSIL y mínima en HSIL y carcinomas.
- Imposibilidad de saber el tipo de HPV presente en una lesión, ya que todos los tipos virales tienen la misma morfología.

I.4.4. METODOS INMUNOLOGICOS.

El diagnóstico inmunológico de la infección por HPV se basa, bien en la detección de anticuerpos específicos dirigidos contra los distintos tipos de HPV en el suero y/o secreciones cervicales y vaginales de los pacientes infectados mediante ELISA y Western blot, bien en la detección de antígenos víricos en cortes de tejido mediante técnicas de inmunohistoquímica.

I.4.4.1. Serología.

Ante la ausencia de un sistema de propagación de HPV en cultivo, los primeros estudios de la respuesta humoral en pacientes infectados por HPV se realizaron con viriones purificados obtenidos por centrifugación en gradientes de densidad a partir de extractos de tejido lesional^{224,225}. Sin embargo, estos estudios presentaron muchos problemas, entre los que cabe señalar la pureza de la

preparación antigénica y la heterogeneidad de las poblaciones estudiadas en cuanto a edad, estado inmune, tipos de lesión y tipos de HPV responsables de la infección.

Por ello, la tecnología ha evolucionado hacia la obtención de proteínas virales específicas *in vitro*. La estrategia con la que se están obteniendo mejores resultados consiste en la obtención de proteínas de fusión, que implica la utilización de vectores de expresión. Estos son plásmidos de ADN que contienen un gen que codifica para una proteína conocida, cuya síntesis se puede inducir artificialmente en cultivos bacterianos. La técnica consiste en clonar una secuencia de ADN de HPV correspondiente a una unidad de transcripción concreta, insertándola en el vector de expresión a continuación del gen conocido y con la orientación adecuada, de manera que al inducir la síntesis de proteínas se obtiene una proteína quimérica de fusión, en la que la proteína codificada por la secuencia de HPV está unida covalentemente a la proteína codificada por el vector de expresión original^{94,226-228}. Los estudios más intensivos, en este sentido, han sido realizados por Firzlaff y cols.²²⁶ y Jenison y cols.²²⁷, clonando secuencias de ADN de HPV 6, 16 y 18 en el vector pATH, plásmido que contiene el gen que codifica para la antranilato sintetasa o gen Trp E. Las proteínas de fusión así obtenidas se utilizan posteriormente para detectar anticuerpos anti-HPV en el suero de pacientes mediante técnicas inmunológicas como el ELISA y el Western blot^{227,229-232}.

Otra estrategia consiste en el estudio de oligopéptidos sintéticos solapantes que cubren unidades transcripcionales del genoma vírico, a fin de encontrar epitopos lineales específicos de tipo para desarrollar, como en el caso anterior, métodos diagnósticos que permitan identificar anticuerpos específicos anti-HPV tanto en el suero como en secreciones cervicales y vaginales de pacientes^{233,234}.

I.4.4.2. Inmunohistoquímica (IHQ).

En 1978, Orth y colaboradores informaron que el suero de un conejo con un tumor derivado de un papiloma producido por un virus del papiloma reaccionaba con verrugas cutáneas humanas²³⁵. Esta reactividad desaparecía al incubar el suero de conejo con viriones de HPV desnaturalizados con álcali.

Dos años más tarde, en 1980, Jenson y cols.⁴³ comprobaron que anticuerpos obtenidos contra viriones rotos de HPV procedentes de verrugas cutáneas daban reacción cruzada con todos los virus del papiloma y, en 1981, Kurman y cols.⁴⁴ informaron que antisueros anti-virus del papiloma bovino (BPV) daban también reacción cruzada con todos los virus del papiloma.

Esta característica se ha utilizado para detectar la presencia de HPV en cortes de biopsias genitales mediante métodos inmunohistoquímicos. Las técnicas más usadas se basan en la utilización de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) y del complejo avidina-biotina (ABC), de mayor sensibilidad^{236,237}, empleando como anticuerpo primario un anticuerpo policlonal obtenido inmunizando conejos con viriones rotos de BPV o de HPV procedentes de verrugas cutáneas. Este anticuerpo reacciona con la proteína principal de la cápside del virus, codificada por la región L1 del genoma vírico²³⁸⁻²⁴⁰, por lo que el marcaje se detecta exclusivamente en células diferenciadas del tercio superior del epitelio, fundamentalmente coilocitos^{44,157,237,239-243}, en las que tiene lugar la síntesis de las proteínas estructurales del virus.

El uso inmunohistoquímico de este anticuerpo es sólo útil en infecciones productivas, como lo demuestra el hecho de que el número de biopsias antígeno-positivas disminuye a medida que aumenta la severidad de la lesión^{240,244-247}.

Otro inconveniente de las técnicas de inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-virus del papiloma es que únicamente sirven como técnicas de detección y no de tipado, ya que al utilizarse un anticuerpo específico de género

reacciona por igual con todos los tipos de HPV. A fin de paliar esto, se están ensayando anticuerpos obtenidos a partir de proteínas de fusión o de oligopéptidos sintéticos dirigidos contra epitopos específicos de los distintos tipos virales^{239,248-252}. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento son contradictorios, sobre todo cuando se comparan con los obtenidos mediante Western blot y ELISA^{239,252}. Incluso en ocasiones los resultados varían dependiendo de que las biopsias utilizadas en estos estudios hayan sido congeladas o fijadas en formol e incluidas en parafina²⁵³. Por ello, y teniendo en cuenta además que el número de anticuerpos específicos de distintos tipos virales es todavía muy reducido, el tipado inmunohistoquímico de una lesión producida por HPV no es posible en la actualidad de manera rutinaria.

I.4.5. HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS.

El diagnóstico de la infección genital por HPV mediante técnicas de hibridación se basa en la detección de secuencias de ácidos nucleicos, ADN o ARN, específicas de HPV mediante el uso de sondas marcadas.

Las sondas son moléculas de ácidos nucleicos cuya secuencia de nucleótidos es complementaria de aquella que se quiere detectar. Para el tipado de HPV habitualmente se usan sondas de ADN obtenidas clonando el genoma completo de cada tipo de HPV aislado, o una parte de él, en plásmidos bacterianos. A continuación, o bien se marca el plásmido completo, o bien se libera el ADN de HPV del plásmido mediante la adecuada enzima de restricción y se marca después de purificarlo por electroforesis en gel.

El marcaje de estas sondas puede ser radioactivo (^3H , ^{32}P , ^{35}S) o no radioactivo (biotina, digoxigenina), siendo las técnicas de "nick translation"²⁵⁴ y "random primer"²⁵⁵ las más utilizadas para realizar este marcaje.

De forma alternativa se pueden obtener sondas de ARN insertando el ADN

de interés en un vector que contenga un promotor de ARN polimerasa. Posteriormente, se sintetiza una sonda de ARN marcada usando ARN polimerasa y nucleótidos marcados¹²⁸.

Se han utilizado una gran variedad de técnicas de hibridación para tipar el HPV presente en muestras ginecológicas. Algunas de estas técnicas requieren aislamiento del ADN celular, mientras que otras se realizan sobre cortes de tejido o células procedentes de citologías ginecológicas. A continuación se comenta brevemente la teoría de hibridación, en la que se basan estas técnicas, y se describen someramente las más utilizadas en el diagnóstico de la infección por HPV. En la tabla I.V se comparan la sensibilidad, ventajas e inconvenientes de las mismas.

I.4.5.1. Teoría de hibridación.

Las técnicas de hibridación se basan en el apareamiento de dos cadenas de ácidos nucleicos, sonda y secuencia diana, en virtud de la complementariedad de las bases nitrogenadas que constituyen su secuencia. En este sentido, hay que tener en cuenta varios puntos:

- La estabilidad del híbrido depende de la composición de bases de ambas cadenas, la longitud del híbrido, la concentración salina del buffer en el que se realiza la hibridación, la temperatura a la que ésta se lleva a cabo y el porcentaje de bases no complementarias entre las dos cadenas ("mismatch", según la terminología inglesa).

Aplicado a la hibridación de moléculas de ADN de varios cientos de nucleótidos de longitud todo esto se puede expresar por la fórmula⁷²:

$$T_m = 81.5 + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%G+C) - 0.72 (\% \text{ formamida})$$

donde **T_m** o temperatura de fusión es la temperatura a la cual la mitad

de los dúplex están disociados. M es la concentración de cationes monovalentes en moles/l y %G+C es el porcentaje de residuos de guanina más citosina en el ADN.

- La temperatura óptima de formación del híbrido es 25°C por debajo de la T_m del dúplex.
- Para un dúplex de más de 150 pares de bases la T_m disminuye 1°C por cada 1% de bases no complementarias⁷².

La "permisividad" de una hibridación ("stringency", según la terminología inglesa) se define como el número de grados centígrados por debajo de la T_m a los que se realiza la hibridación o el lavado de posthibridación, y se expresa como T_m - número de grados.

En el caso de HPV, las condiciones relajadas de hibridación ("low stringency", según la terminología inglesa) se definen como T_m - 43°C. Esto se consigue utilizando concentraciones bajas de formamida en el tampón de hibridación (alrededor del 20%) y aumentando la concentración salina en el tampón del lavado de posthibridación. Con estas condiciones se consigue que híbridos con un 33% de bases desapareadas permanezcan estables²⁵⁶.

Las condiciones estrictas de hibridación ("high stringency", según la terminología inglesa) más utilizadas para HPV se definen como T_m - 25°C. Esto se consigue aumentando la concentración de formamida en el tampón de hibridación (alrededor del 50%) y disminuyendo la concentración salina en el lavado de posthibridación. Con estas condiciones se consigue que permanezcan estables híbridos con un 13% de bases desapareadas²⁵⁶. Sin embargo, si se quiere aumentar más la especificidad, aún a costa de perder sensibilidad, la hibridación se puede llevar a cabo en condiciones todavía más estrictas, hasta T_m - 5°C^{97,98,257}.

El uso de unas condiciones u otras depende del objetivo que se persiga.

Cuando la información que se quiere obtener es, simplemente, si una lesión está producida por un HPV o no ("screening" o "detección") lo ideal es realizar una hibridación en condiciones relajadas utilizando un cóctel de sondas específicas de varios tipos de HPV o bien sondas específicas de las regiones más conservadas del genoma de HPV (E1 y L1 principalmente, seguidas por E2 y L2)^{75,81,258}. En estas condiciones, la probabilidad de detectar la presencia de cualquier HPV, incluidos tipos aún no descritos, es muy elevada. Por el contrario, cuando se quiere conocer el tipo de HPV presente en una lesión ("tipado") lo ideal es utilizar varias sondas específicas de distintos tipos virales y realizar las hibridaciones en condiciones estrictas, con lo que únicamente se obtendrá una reacción positiva con la sonda específica del tipo viral presente en la lesión.

I.4.5.2. Southern blot.

El Southern blot se considera la técnica de referencia para el tipado de HPV en lesiones genitales. Fue descrita por primera vez por Southern en 1975²⁵⁹ y, básicamente, consiste en lo siguiente:

El ADN celular total de la muestra en estudio se extrae y se digiere con una enzima de restricción. Los fragmentos obtenidos se separan mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida. A continuación el ADN se desnaturaliza y se transfiere a filtros de nylon o nitrocelulosa. Finalmente, el ADN en el filtro se hibrida con sondas apropiadas para el estudio que se está realizando.

Para la detección de HPV en muestras genitales las enzimas de restricción más utilizadas son la Pst I y la Hpa II⁹⁶, ya que el tamaño de los fragmentos que producen son diferentes para cada uno de los tipos de HPV que infectan más frecuentemente el tracto genital. Una vez transferido el ADN al filtro de nitrocelulosa se puede realizar una hibridación con un cóctel de sondas de HPV en condiciones relajadas, con lo que se obtiene una información sugestiva del tipo

de HPV presente en la muestra según el patrón de bandas obtenido con el enzima de restricción. El tipado definitivo sólo es posible realizando una serie de hibridaciones con sondas únicas específicas de los distintos tipos de HPV en condiciones estrictas⁷².

A pesar de ser una técnica de gran sensibilidad y especificidad, el Southern blot presenta algunos inconvenientes cuando se considera su uso rutinario como método diagnóstico (tabla I.V). Concretamente, requiere cantidades relativamente grandes de ADN celular de partida (10 μ g), obtenido de material no fijado, y utilizar sondas de ADN marcadas con ³²P con alta actividad específica (2-4 x 10⁸ cpm/ μ g). En estas condiciones se pueden detectar 0.1-1 pg de ADN de HPV, lo que equivale aproximadamente a 1 copia de ADN de HPV por 10-100 células^{72,260}. La técnica se puede realizar también a partir de ADN extraído de tejido fijado en formol²⁶¹⁻²⁶⁴, pero la sensibilidad disminuye mucho, hasta el punto de que se pueden obtener porcentajes de detección de ADN de HPV inferiores en un 70% a los obtenidos en material no fijado de las mismas lesiones²⁶⁴. Algo similar ocurre con el marcaje, de forma que la sensibilidad disminuye mucho cuando se usan sondas no marcadas radioactivamente.

I.4.5.3. Dot blot.

El Dot blot se desarrolló para facilitar el análisis rápido de un gran número de muestras. La diferencia principal con el Southern blot consiste en que el ADN en estudio se coloca directamente sobre el filtro en el que se llevará a cabo la hibridación. La técnica puede realizarse de dos maneras diferentes⁹⁶:

- A) Se extrae el ADN celular total de la muestra en estudio y se coloca puntualmente sobre un filtro de nitrocelulosa o nylon mediante un sistema de vacío. Después el ADN es desnaturalizado, neutralizado y fijado al filtro para poder realizar la hibridación.

- B) Una suspensión celular de partida se incuba con un tampón de digestión, se trata con álcali para desnaturalizar el ADN y a continuación se coloca la suspensión entera sobre un punto del filtro donde se llevará a cabo la hibridación.

Esta técnica permite la detección de cantidades muy pequeñas de ADN de HPV (0.01 pg de ADN)²⁶⁵, probablemente debido a la concentración que experimenta la muestra. Sin embargo, ésta es también la causa de su principal inconveniente: se produce un porcentaje elevado de hibridación no específica y, en consecuencia, de falsos positivos, posiblemente porque la muestra se concentra tanto que no es posible bloquear todas las secuencias de ADN celulares mediante prehibridación.

Así pues, para su uso rutinario se parte de cantidades pequeñas de ADN celular (300-500 ng) y la hibridación se realiza sólo en condiciones estrictas, consiguiéndose así una sensibilidad aproximada de 1 copia de ADN de HPV/célula.

I.4.5.4. Reverse blot.

El Reverse blot es la técnica contraria al Southern blot. De Villiers y cols. fueron los primeros en aplicarla al estudio de la infección por HPV¹⁸⁶, siendo modificada posteriormente por Webb y cols.¹⁵⁸.

En este método, el ADN clonado de los distintos tipos de HPV aislados se separa del vector plasmídico, se digiere con enzimas de restricción (PstI) y los fragmentos resultantes se separan mediante electroforesis en gel y se transfieren a filtros de nitrocelulosa. A continuación se hibridan con 500 ng de ADN celular, previamente radiomarcado, procedente de la muestra en estudio. Cualquier ADN de HPV presente en la muestra hibridará con el ADN del tipo de HPV presente

en el filtro que sea complementario. La hibridación puede realizarse en condiciones relajadas y estrictas, permitiendo tanto la detección como el tipado de HPV. La sensibilidad de la técnica es de aproximadamente 1 copia de ADN de HPV/célula¹⁵⁸.

Su principal desventaja es que requiere reacciones de marcaje individuales para cada ADN celular que se quiera analizar, lo que la hace bastante laboriosa y larga.

I.4.5.5. Hibridación *in situ* en tejido (HIS).

La hibridación *in situ* en tejido se diferencia de las técnicas anteriores en que no es necesario extraer el ADN celular, sino que la hibridación se realiza directamente sobre cortes del tejido. Este método aporta, por lo tanto, información adicional sobre la distribución topográfica de los ácidos nucleicos de HPV en una lesión.

Varios factores influyen en los resultados obtenidos con esta técnica:

1. Fijación del tejido:

El fijador ideal para realizar técnicas de HIS ha de cumplir dos condiciones: conservar histológicamente el tejido lo mejor posible y evitar la degradación de los ácidos nucleicos virales. En este sentido, los mejores resultados se obtienen con paraformaldehído²⁶⁶, a pesar de que no suele utilizarse de manera rutinaria. De los fijadores usados habitualmente, el más apropiado para realización de esta técnica es el formol tamponado^{264,267}, que cumple perfectamente las dos condiciones señaladas anteriormente. Por el contrario, hay que evitar en lo posible el empleo de la solución de Bouin como fijador, ya que, si bien conserva mejor la arquitectura del tejido que el formol tamponado,

produce degradación del ADN. En un estudio realizado por Nuovo y Richart²⁶⁷ comparando ambos fijadores, tras ocho horas de fijación la señal de hibridación en las muestras fijadas con solución de Bouin era un 50% menor que la obtenida en muestras fijadas con formol tamponado.

2. Adherencia del tejido al portaobjetos:

Dado que esta técnica se realiza directamente sobre cortes del tejido es fundamental que éstos no se despeguen del portaobjetos a lo largo del proceso. Con los adhesivos habituales (albúmina, gelatina-alumbre de cromo, cola de Elmer, etc.) el porcentaje de cortes que se despegan es muy elevado, por lo que hay que utilizar adhesivos especiales, como la poli-L-lisina^{120,199,266,268} y los derivados de organosilano²⁶⁹. Estos últimos son los que dan mejores resultados (prácticamente un 100% de adherencia).

3. Digestión enzimática del tejido:

El pretratamiento enzimático del tejido antes de realizar la hibridación es un punto clave para optimizar los resultados obtenidos con esta técnica, sobre todo si se emplea un fijador que produzca uniones entrecruzadas entre proteínas como el formol tamponado. La finalidad de esta digestión enzimática es permeabilizar el tejido y liberar al ADN de su unión a proteínas de manera que las sondas puedan alcanzar perfectamente sus secuencias diana.

Las dos enzimas más utilizadas son la pepsina, previa hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 0.1N, y la proteinasa K. Las concentraciones enzimáticas y los tiempos de incubación dependen del tipo de tejido estudiado y, en el caso de la proteinasa K, del tiempo de fijación con formol tamponado⁹⁶.

4. Hibridación:

Las sondas se emplean diluidas en una mezcla de hibridación de composición compleja. En ella se incluyen agentes que bloquean las uniones no específicas de las sondas al tejido, como la solución de Denhardt²⁷⁰, el dodecil sulfato sódico (SDS) y el ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado; sustancias como el sulfato de dextrano o el polietilen glicol, que aumentan la concentración efectiva de la sonda, acelerando la hibridación²⁷¹⁻²⁷³; formamida, en concentración variable según las condiciones en las que se quiera realizar la hibridación; y un tampón, normalmente tampón citrato salino (SSC), cuya concentración depende también de las condiciones en las que se quiere realizar la hibridación, aunque habitualmente se suelen emplear soluciones de alta fuerza iónica (6x SSC) para maximizar el apareamiento de la sonda con su secuencia diana.

Con el empleo de este tipo de mezclas de hibridación no es necesario realizar un paso previo de prehibridación, excepto en el caso de la hibridación ARN-ARN, sobre todo si se emplean sondas marcadas con ³⁵S, en cuyo caso sí conviene realizar una prehibridación para intentar minimizar el ruido de fondo.

Cuando se emplean sondas de ADN, una vez añadidas al tejido la desnaturalización de la sonda y del ADN del tejido se realiza calentando el portaobjetos en una placa calefactora a 95-100°C.

5. Lavado de posthibridación:

Este es un paso fundamental en el que se fijan las condiciones de "permisividad" de la técnica (condiciones relajadas o estrictas). Están implicados tres parámetros: fuerza iónica del tampón empleado en el lavado, concentración de formamida en el mismo y temperatura a la que se realiza.

6. Detección del dúplex sonda-secuencia diana:

El método de detección del híbrido va a depender del tipo de marcaje de la sonda empleada. En el caso de sondas marcadas radioactivamente los portaobjetos se recubren de una emulsión fotográfica. El tiempo de exposición depende del isótopo empleado en el marcaje (3-4 días para ^{35}S , 30 días para ^3H).

Cuando se emplean sondas marcadas con biotina la detección del dúplex se realiza con un complejo avidina-biotina-enzima más el correspondiente par sustrato/cromógeno, con lo que se obtiene una reacción coloreada. Las enzimas más utilizadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina.

En el caso de sondas marcadas con digoxigenina la detección del híbrido se realiza por métodos inmunohistoquímicos con un anticuerpo anti-digoxigenina.

La sensibilidad de la HIS es menor que la de las técnicas en filtro. Utilizando sondas marcadas con ^{35}S se estima alrededor de 50 copias de ADN de HPV/célula¹⁴⁹ y con sondas marcadas con ^3H alrededor de 5 copias/célula¹⁴⁴. Con sondas biotiniladas recientes estudios señalan que la sensibilidad de la HIS es similar o mejor a la obtenida con sondas marcadas con ^{35}S ^{274,275}.

A pesar de este inconveniente, la HIS presenta varias ventajas con respecto a las técnicas anteriores (tabla I.V), sobre todo cuando se emplea marcaje no radioactivo: permite la realización de estudios retrospectivos sobre material fijado en formol e incluido en parafina, da información sobre la localización de los ácidos nucleicos de HPV en el tejido y permite la detección de ADN de HPV en muestras que resultan negativas por Southern blot en las que hay sólo un número muy reducido de células infectadas con un número elevado de copias^{276,277}.

<u>TECNICA</u>	<u>SENSIBILIDAD</u>	<u>VENTAJAS</u>	<u>INCONVENIENTES</u>
Southern blot	0.1-0.01 copias/cél.	<ul style="list-style-type: none"> • Detección y tipado • Análisis de restricción 	<ul style="list-style-type: none"> • 10 µg de ADN celular • Sondas radioactivas • Material fresco • Largo (2-14 días) y laborioso
Dot blot	1 copia/cél.	<ul style="list-style-type: none"> • 500 ng de ADN celular • Análisis simultáneo de varias muestras • Técnicamente sencillo 	<ul style="list-style-type: none"> • Sondas radioactivas • Material fresco • Falsos positivos • Sólo tipado • Largo (1-4 días)
Reverse blot	1 copia/cel.	<ul style="list-style-type: none"> • Detección y tipado • 500 ng de ADN celular 	<ul style="list-style-type: none"> • Reacciones de marcaje individual para cada muestra • Marcaje radioactivo • Material fresco • Largo (varios días) y laborioso
Hibridación <i>in situ</i> en tejido	20-50 copias/cél.	<ul style="list-style-type: none"> • Correlación con hallazgos histológicos • Detección y tipado • Sondas no radioactivas • Material fresco o fijado • Estudios retrospectivos • Rápido (<1 día) • Técnicamente sencillo 	<ul style="list-style-type: none"> • Menor sensibilidad
Hibridación <i>in situ</i> en filtro	No establecida	<ul style="list-style-type: none"> • Análisis simultáneo de varias muestras • Técnicamente sencillo 	<ul style="list-style-type: none"> • Sondas radioactivas • Falsos positivos • Sólo tipado

Tabla I.V. Ventajas e inconvenientes de las principales técnicas diagnósticas de la infección genital por HPV basadas en hibridación de ácidos nucleicos.

I.4.5.6. Hibridación *in situ* en filtro.

Esta técnica se emplea para detectar secuencias de ADN de HPV en material procedente de una toma citológica cérvico-vaginal. Para realizarla, este material se coloca directamente en un filtro, el cual se trata adecuadamente para romper las células y desnaturalizar y neutralizar el ADN antes de realizar la hibridación^{109,154,155,192,278}.

Es una técnica muy similar al Dot blot, con la ventaja de que no es necesario extraer el ADN celular. Sin embargo, presenta los mismos inconvenientes que el Dot blot por lo que respecta a los falsos positivos. La sensibilidad estimada para esta técnica varía según los autores. Así, Caussy y cols.²⁷⁹ fueron capaces de detectar 100 células CaSki (células de un carcinoma cervical que contienen aproximadamente 500 copias de ADN de HPV 16/célula), mientras que Cornelissen y cols.²⁸⁰ no pudieron detectar menos de 10^5 células CaSki. Si se la compara con el Southern blot y el Dot blot, su sensibilidad es aproximadamente la tercera parte de la de estas técnicas^{109,279,280}, a pesar de modificaciones incluidas por algunos autores tratando de aumentarla²⁸¹.

I.4.5.7. Técnica sandwich.

Consiste en clonar dos fragmentos no solapantes del ADN de un tipo concreto de HPV, uno en el bacteriófago M13 y otro en el plásmido pBR322. El ADN de M13-HPV se inmoviliza en un filtro, mientras que el ADN de pBR322-HPV se marca radioactivamente. A continuación el filtro se incuba en condiciones de hibridación con una mezcla del ADN marcado y células rotas procedentes de una toma citológica cérvico-vaginal. Si en la muestra en estudio hay ADN del mismo tipo viral hibridará, por una parte, con el ADN de M13-HPV unido al filtro y, por otra parte, con el ADN de pBR322-HPV marcado. El ADN marcado que no ha hibridado se elimina con lavados y la radioactividad que permanece unida al filtro puede medirse rápidamente en un contador de centelleo. De esta forma, la

presencia de radioactividad unida al filtro implica la presencia de ADN del HPV en cuestión en la muestra^{282,283}.

La sensibilidad de la técnica se ha estimado en 1 a 5 veces mayor que la del Dot blot y presenta la ventaja de no requerir autorradiografía para detectar los híbridos, con la consiguiente ganancia de tiempo.

I.4.6. AMPLIFICACION DE ADN: REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de la terminología inglesa "polymerase chain reaction") es una técnica de muy reciente desarrollo^{284,285} que permite la amplificación de una secuencia concreta de ADN *in vitro*, siendo en la actualidad la de mayor sensibilidad para el diagnóstico de la infección por HPV. Se fundamenta en el empleo de dos pequeños oligonucleótidos, denominados cebadores o "primers", complementarios de las regiones que flanquean la secuencia que se quiere amplificar en cadenas opuestas. Estos cebadores se colocan en condiciones de hibridación con el ADN desnaturalizado extraído de una muestra en estudio, de manera que si en el ADN se encuentran presentes sus respectivas secuencias diana, se forman los correspondientes híbridos. En presencia de una ADN polimerasa y de nucleótidos trifosfato se produce la elongación de cada cadena en direcciones opuestas y solapantes sintetizándose nuevamente la secuencia que nos interesa. Repitiendo el ciclo de desnaturalización, hibridación de los cebadores a sus secuencias diana y elongación 30-40 veces se puede llegar a conseguir más de 1 μ g del fragmento específico de HPV que nos interesa. Esto es posible gracias al empleo de ADN polimerasas termoestables, siendo la más utilizada la Taq polimerasa, aislada del microorganismo *Thermus aquaticus*.

El producto amplificado es fácilmente detectable mediante electroforesis en gel, sugiriendo la presencia de HPV en las muestras en estudio. La confirmación

requiere transferir el ADN a un filtro y realizar una hibridación con una sonda específica del HPV que se considera.

La PCR se puede realizar también a partir de tejido fijado en formol e incluido en parafina, sin extracción previa del ADN²⁸⁶, por lo que permite realizar estudios retrospectivos. Su sensibilidad es tan elevada que permite detectar una copia de ADN de HPV en 10^5 células^{72,287}.

Su principal inconveniente deriva precisamente de su gran sensibilidad, ya que cualquier contaminación, por pequeña que sea, al amplificarse da lugar a falsos positivos. Esta contaminación puede proceder de los propios productos de amplificación generados por la PCR y de los plásmidos portando secuencias de HPV utilizadas como sondas en las técnicas de hibridación²⁸⁸. Varios autores han descrito protocolos para intentar evitar las contaminaciones^{288,289}, pero aún así es muy difícil evitarlas por completo²⁹⁰.

Todo esto, unido a la falta de estandarización en las condiciones en que se realiza la PCR en lo que respecta a cebadores, polimerasas, mezclas de reacción, etc., hace que los resultados publicados en varios países por diversos autores sean contradictorios^{287,291-303}.

II. OBJETIVOS

Las lesiones genitales relacionadas con HPV constituyen un campo en el que la biología molecular ha tenido un gran impacto a muchos niveles. Estudios de transformación celular⁴⁹⁻⁵⁶, expresión génica⁸³⁻⁹⁶ y organización del genoma^{89,93} han ligado el HPV a procesos neoplásicos y han aportado datos que sugieren rutas potenciales a través de las cuales el genoma viral ejercería su efecto en las células. Estudios epidemiológicos con material clínico han permitido definir perfiles de población de riesgo⁶⁸ y han asociado tipos específicos de HPV con neoplasias. Con la tecnología de proteínas de fusión^{94,226-228} se está produciendo una batería de anticuerpos contra proteínas virales específicas, que en un futuro próximo facilitarán mapear su distribución en los tejidos infectados y clarificar la respuesta inmune del paciente a la infección por HPV. Aunque todos estos estudios multidisciplinarios ayudan a comprender la infección genital por HPV y a clarificar el papel de este virus en el desarrollo y evolución de neoplasias, **no se ha establecido todavía la utilidad clínica de esta información.**

Por otro lado, estudios de seguimiento a largo plazo demuestran que sólo un porcentaje de lesiones asociadas a HPV progresan. Yliskoski y cols.³⁰⁴, en un reciente trabajo, señalan que, en general, el 56.7% de lesiones asociadas a HPV regresan, el 24.5% persisten y el 16.5% progresan. Estos valores varían según el grado de la lesión y el tipo de HPV que la origina y, probablemente, dependen de la respuesta inmune del paciente y de una serie de cofactores^{100,305-308}. Aunque son importantes para comprender el potencial biológico de displasias y neoplasias, **estas estadísticas no ofrecen ninguna información al patólogo**, quien con frecuencia debe evaluar un caso estudiando una o dos muestras citológicas y una única biopsia con técnicas de tinción convencionales.

Ante una lesión con potencialidad de evolución maligna, **los clínicos demandan el máximo de información** para tomar la decisión terapéutica mas adecuada. La inmunohistoquímica permite confirmar la presencia de HPV en un tejido al detectar antígenos de la cápside del virus. La hibridación *in situ* posibilita la detección del tipo concreto de HPV asociado a una lesión o, por lo menos, su inclusión en un grupo de riesgo con respecto a la carcinogénesis. **En España esta técnica está poco desarrollada y los datos de que se disponen son muy**

escasos.

Con este trabajo, hemos pretendido obtener la máxima información de una biopsia ginecológica combinando técnicas propias de un laboratorio de anatomía patológica, algunas clásicas, como la observación microscópica de preparaciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina y la inmunohistoquímica, y otras de reciente incorporación, como la hibridación *in situ*.

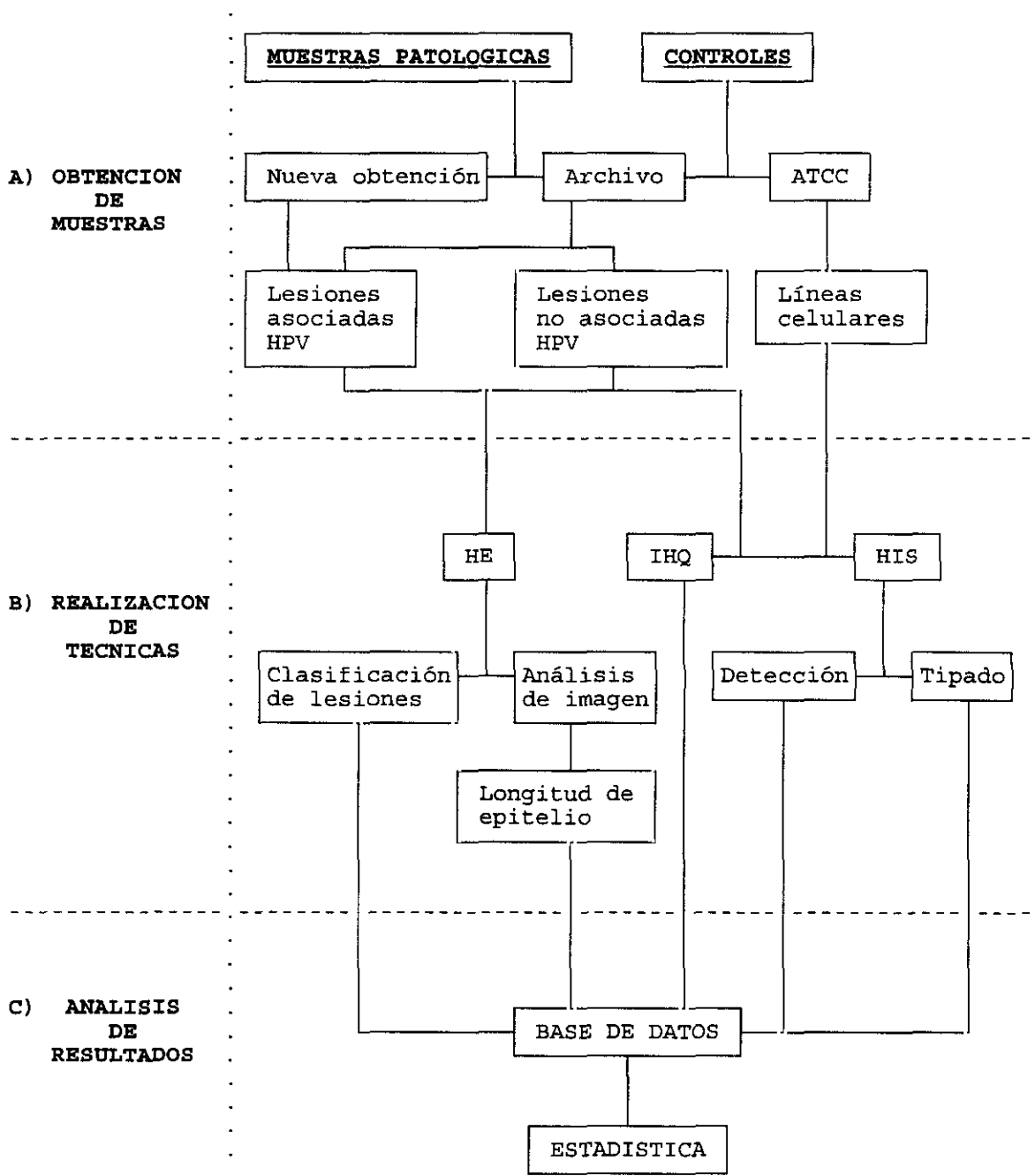
Por todo ello nos planteamos en el presente trabajo los siguiente objetivos:

1. Comprobar la utilidad de la inmunohistoquímica como técnica diagnóstica de la infección genital por HPV.
2. Establecer el tamaño más adecuado de una biopsia genital para minimizar el número de falsos negativos por hibridación *in situ*.
3. Comprobar la utilidad de la hibridación *in situ* como técnica diagnóstica de la infección genital por HPV.
4. Estudiar la distribución de los grupos de HPV de bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo de carcinogénesis en lesiones genitales benignas, lesiones con potencialidad de evolución maligna y lesiones malignas.
5. Realizar un estudio comparativo entre inmunohistoquímica e hibridación *in situ*.
6. Estudiar las características morfológicas de la hibridación *in situ* con fines pronósticos.
7. Desarrollar nuevas técnicas que combinen inmunohistoquímica e hibridación *in situ* y que aporten mayor información al estudio de la infección genital por HPV.

III. MATERIAL Y METODOS

III.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para conseguir los objetivos mencionados en el capítulo anterior se diseñó la siguiente metodología experimental, dividida en tres fases:



ATCC: American Type Culture Collection.

HE : Hematoxilina-eosina.

IHQ : Inmunohistoquímica.

HIS : Hibridación in situ.

III.2. MATERIAL.

III.2.1. BIOPSIAS GENITALES.

Se han estudiado un total de 244 biopsias de tracto genital inferior femenino: 40 de vulva y 204 de cérvix uterino, tanto de archivo como de nueva obtención, procedentes de los siguientes centros:

A) Muestras de archivo:

- Archivo de Anatomía Patológica de la Residencia de la Seguridad Social Nuestra Señora de Sonsoles de Avila (años 1978-1990).
- Archivo de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca (años 1982-1992).

B) Muestras de nueva obtención:

- Centro de Orientación Familiar (COF) de Guadalajara.
- Centro Penitenciario Femenino (CPF) de Madrid.
- Centros de Salud del Ayuntamiento de Madrid.

La distribución de muestras por su procedencia se especifica en la tabla III.1. y en las figuras III.1 y III.2.

	<u>VULVA</u>	<u>CERVIX</u>	<u>TOTAL</u>
Salamanca	13	48	61
Avila	14	71	85
Guadalajara	3	29	32
CPF Madrid	10	40	50
Ayuntamiento Madrid	--	16	16
T O T A L	40	204	244

(CPF: Centro Penitenciario Femenino)

Tabla III.1. Distribución de las biopsias estudiadas según su procedencia y localización anatómica.

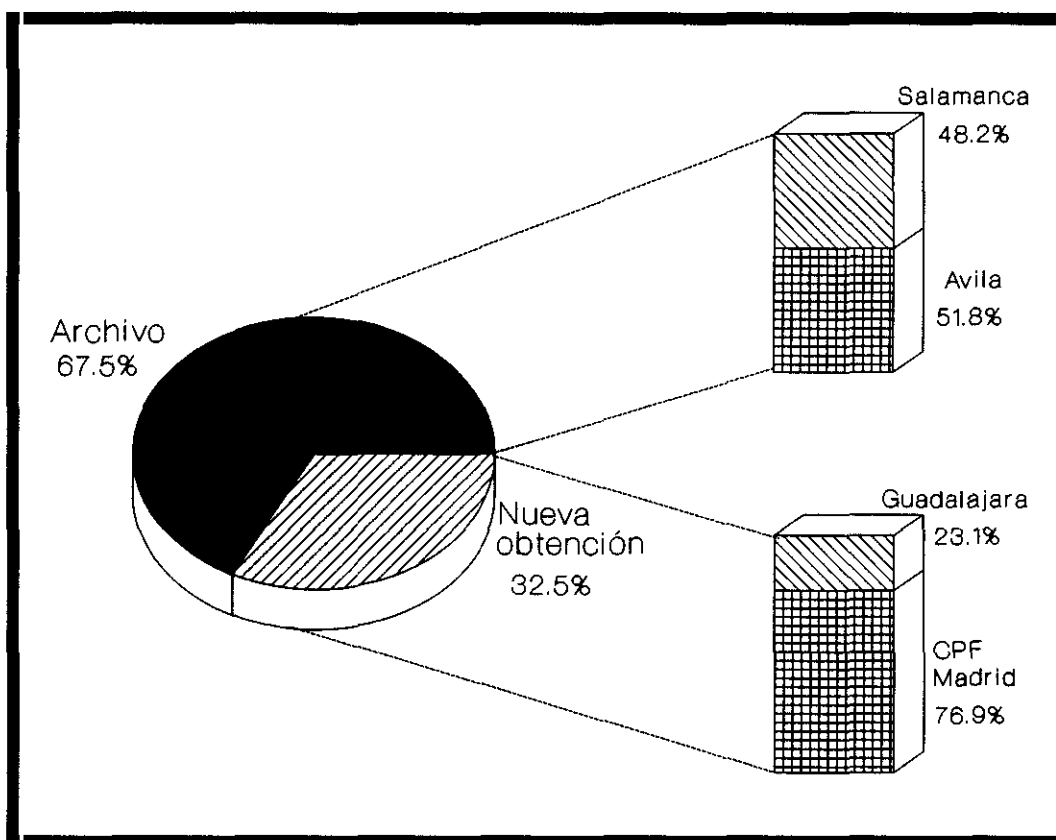


Figura III.1. Distribución porcentual de las biopsias de vulva según su procedencia (n=40).

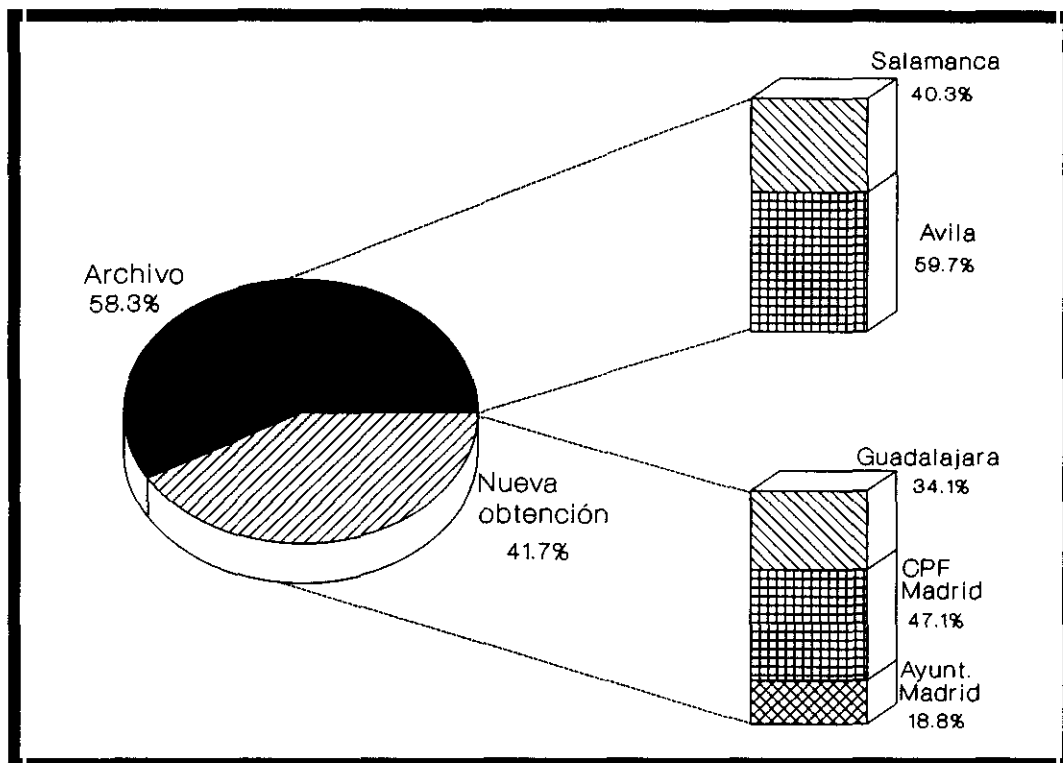


Figura III.2. Distribución porcentual de las biopsias de cérvix uterino según su procedencia (n=204).

III.2.1.1. Biopsias de archivo.

Las piezas de archivo se obtuvieron tras revisar los correspondientes archivos de diagnósticos. Se eligieron aquellas biopsias genitales diagnosticadas como condilomas, displasias, neoplasias intraepiteliales y carcinomas. Del archivo del Hospital Clínico Universitario de Salamanca se escogieron, además, 24 biopsias correspondientes a lesiones no asociadas a HPV.

Todas las piezas elegidas se recuperaron en forma de bloques de parafina, asegurándonos previamente de que en ambos Centros y durante los años revisados las biopsias ginecológicas fueron fijadas en formol tamponado.

Se obtuvieron cortes de 7 μm y se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina, a fin de reclasificar las lesiones asociadas a HPV según el sistema de

Bethesda, o para confirmar el diagnóstico de las lesiones cervicales no asociadas a HPV. Estas últimas se clasificaron en pólipos cervicales, hiperqueratosis y cervicitis crónica, según los siguientes criterios:

1. **Pólipo cervical:** Lesión sobreelevada con pedículo, tapizada en superficie por epitelio escamoso, con estroma fibrovascular.
2. **Hiperqueratosis:** Aumento de la capa de queratina en el epitelio cervical.
3. **Cervicitis crónica:** Alteración inflamatoria de la zona de transición exo-endocervical con infiltrado de linfocitos y células plasmáticas.

III.2.1.2. Biopsias de nueva obtención.

Las biopsias nuevas se obtuvieron de pacientes con resultados citológicos previos compatibles con lesiones asociadas a HPV. La toma se realizó, bajo examen colposcópico, de las zonas sospechosas y las piezas fueron fijadas en formol tamponado e incluidas en parafina por métodos rutinarios.

Se estudiaron preparaciones de todas las biopsias teñidas con la técnica de hematoxilina-eosina y a continuación se clasificaron las muestras por diagnósticos.

Las lesiones cervicales no invasivas asociadas a HPV se clasificaron según el sistema de Bethesda (LSIL y HSIL), de acuerdo con los criterios de Crum y Nuovo⁹⁶, con una modificación: los condilomas acuminados se consideraron como un grupo independiente no incluido en las LSIL. Las lesiones de vulva se clasificaron según la terminología VIN (VIN I, VIN II y VIN III). En todos los casos, el diagnóstico de compatibilidad con infección por HPV se basó en la observación de coilocitosis junto con dos de las siguientes características histológicas:

binucleación y/o multinucleación, disqueratosis, papilomatosis y contorno nuclear irregular¹¹⁸.

Los carcinomas invasivos se clasificaron según el grado de diferenciación en bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados, de acuerdo con los criterios de Kurman y cols.¹⁷⁹.

III.2.2. LINEAS CELULARES.

A fin de comprobar la sensibilidad y especificidad de la técnica de hibridación in situ se utilizaron tres líneas celulares establecidas con distinto número de copias de genoma de HPV integrado en su propio genoma:

1. **Células CaSki**, obtenidas a partir de un carcinoma epidermoide de cérvix, con 400-600 copias integradas del genoma de HPV tipo 16³⁰⁹⁻³¹¹.
2. **Células HeLa 229**, obtenidas a partir de un carcinoma epidermoide de cérvix, con 10-50 copias integradas del genoma de HPV tipo 18^{83,311}.
3. **Células SiHa**, obtenidas a partir de un carcinoma escamoso de cérvix, con 1-2 copias integradas del genoma de HPV tipo 16^{310,311}.

Las tres líneas celulares fueron enviadas por la "American Type Culture Collection (ATCC)" en viales congelados.

III.3. METODOS.

Una vez clasificadas las biopsias por lesiones, el procesamiento de todas ellas fue similar:

Se colocaron cortes de 5 μ m de espesor en portaobjetos pretratados con

poli-l-lisina o derivados del silano, y se realizaron las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* para detectar el antígeno estructural común de HPV y secuencias de ADN específicas de HPV, respectivamente.

Los cortes teñidos con hematoxilina-eosina de todas las biopsias, excepto las correspondientes a lesiones invasivas, fueron sometidas a un estudio por análisis de imagen para medir la longitud del epitelio presente en la muestra.

Finalmente, se realizaron técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica sobre extensiones de las tres líneas celulares estudiadas, a fin de comprobar la sensibilidad y especificidad de las técnicas utilizadas.

III.3.1. PRETRATAMIENTO DE LOS PORTAOBJETOS.

Los portaobjetos usados en las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* fueron pretratados con poli-l-lisina o derivados del silano, como adhesivos, para conseguir una buena adherencia de los cortes e impedir que se despegasen durante las sucesivas incubaciones a las que iban a ser sometidos.

A) Poli-l-lisina:

Una vez desengrasados y limpios por inmersión en una mezcla al 50% de alcohol/éter, los portaobjetos se sumergieron en una solución acuosa de poli-l-lisina (Sigma) al 0.02% durante 10 minutos a temperatura ambiente (t.a.). A continuación se lavaron con agua destilada, se dejaron secar al aire y se almacenaron en cajas con desecadores a -20°C hasta su utilización.

B) Derivados del silano:

Se empleó el adhesivo comercial BIOBOND (BioCell Research

Laboratories) diluido al 2% en acetona. Los portaobjetos se sumergieron durante 4 minutos en esta solución y después se lavaron durante 5 minutos con agua destilada. Una vez secos se almacenaron en cajas con desecadores a temperatura ambiente hasta su utilización.

En ambos casos, las preparaciones se incubaron a 56°C durante 24 horas para conseguir una gran adhesividad.

III.3.2. CULTIVO Y PROCESAMIENTO DE LAS LINEAS CELULARES.

Las células enviadas por la ATCC se descongelaron en baño maría a 37°C, se contaron en cámara de Neubauer y se estudió su viabilidad utilizando una solución de azul tripan al 5%. A continuación se cultivaron en frascos de 25 cm² a una concentración de 500.000 células viables/ml a 37°C con un 5% de CO₂. Los medios de cultivo utilizados con cada línea celular fueron los siguientes:

1. Células CaSki: RPMI 1640.
2. Células HeLa 229: Medio mínimo esencial (Eagle) con aminoácidos no esenciales y piruvato sódico.
3. Células SiHa: Medio mínimo esencial (Eagle) con aminoácidos no esenciales y tampón borato salino con albúmina bovina (BBS) de Earle.

Todos los medios de cultivo fueron suplementados con un 10% de suero bovino fetal y antibióticos (7.5 UI/ml de penicilina y 7.5 µg/ml de estreptomicina).

A los cuatro días de cultivo se procedió al cambio de medio y a los 7-8 días, una vez formada una monocapa de células, se realizaron pases. Para ello se trataron las células con tripsina al 0.25% en solución de HANK (Flow

Laboratories) durante 10 minutos a 37 °C. Después de despegadas, las células se lavaron con medio de cultivo fresco, sin aditivos, se contaron en cámara de Neubauer y se pusieron nuevamente en cultivo a una concentración de 500.000 células viables/ml.

Después de tres semanas de cultivo (2 pases) se cosecharon las células por tripsinización. Parte de ellas se alicuotaron en viales de 1 ml, diluidas a una concentración de 5×10^6 células/ml en un medio para congelación de células con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (JRH Biosciences). Las células restantes se lavaron con tampón fosfato salino (PBS), se extendieron en portaobjetos pretratados, se dejaron secar a temperatura ambiente y se fijaron por inmersión en alcohol/acetona al 50% durante 10 minutos a 4 °C. Después se dejaron secar nuevamente y se guardaron en bolsas herméticas con un desecador hasta la realización de las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación in situ.

III.3.3. ANALISIS DE IMAGEN.

Se midió la longitud del epitelio escamoso a nivel de la capa basal de células en todas aquellas biopsias en las que dicha capa celular estaba conservada (biopsias con lesiones no invasivas). Para ello se utilizó un analizador de imagen IMCO 10 (Kontron Bildanalyze) junto con el programa informático MIP (de la terminología inglesa "Microm Image Processing") (Microm España) como software.

Para realizar las medidas se captaron las imágenes microscópicas de las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina, observadas con el objetivo 20x, mediante una cámara de TV color (Hitachi, KP-C503) conectada directamente al microscopio. Estas imágenes se digitalizaron en una matriz de 512 x 512 puntos o "pixels" (de la terminología inglesa "picture element"). A continuación se trazó de forma interactiva una línea siguiendo la capa basal de células del epitelio presente en la imagen, calculándose automáticamente la distancia entre los

extremos y el camino recorrido (fig. III.3).

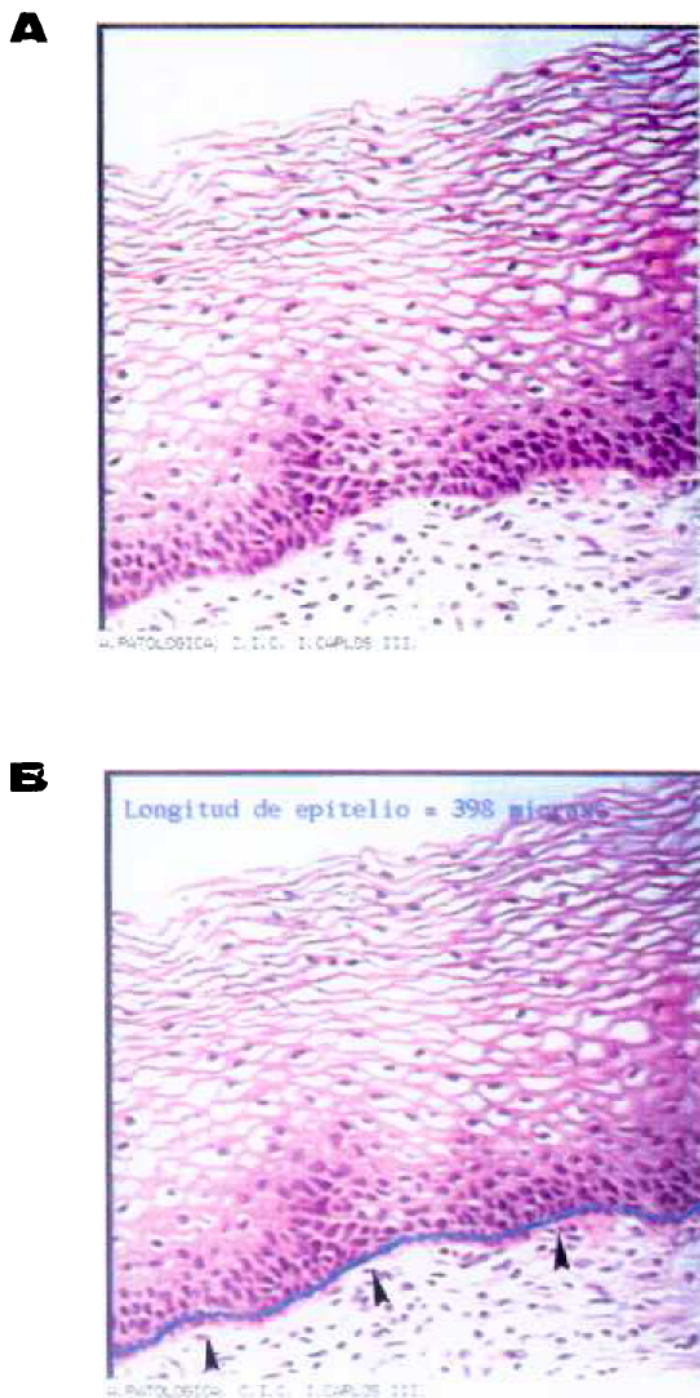


Figura III.3. Medida de la longitud del epitelio presente en una biopsia.

A) Imagen digitalizada correspondiente a una biopsia de cérvix diagnosticada de LSIL.
B) Sobre la imagen anterior se ha trazado de forma interactiva una línea siguiendo la capa basal del epitelio, de forma que el programa utilizado calcula automáticamente el camino recorrido en micras.

Antes de realizar las medidas se calibró todo el sistema con un portaobjetos calibrado (Leitz) para que el resultado final de las medidas fuese expresado en milímetros.

Después de realizar todas las medidas las biopsias se agruparon según la longitud de su epitelio en clases de 1 mm de amplitud, desde una longitud inferior a 2 mm hasta una longitud mayor de 10 mm.

III.3.4. INMUNOHISTOQUIMICA.

La técnica se realizó con un equipo comercial de inmunohistoquímica ("Ultraprobe Universal Kit", Biomedica Corp.) basado en el método avidina-biotina-fosfatasa alcalina, que emplea un anticuerpo secundario polivalente biotinilado.

Como anticuerpo primario se empleó un anticuerpo policlonal de conejo prediluido anti-PV (Biogenex Laboratories), obtenido inmunizando conejos con virus del papiloma bovino tipo 1 (BPV 1). Este anticuerpo da reacción cruzada con todos los virus del papiloma.

Todas las incubaciones se efectuaron en una estación de trabajo para inmunohistoquímica "MicroProbe" (Biomedica Corp.), basada en el principio de "transporte capilar de reactivos"³¹². Se trata de un sistema vertical de inmunohistoquímica, en el que los portaobjetos con la muestra se colocan enfrentados dos a dos, paralelos y verticalmente, con un pequeño espacio entre ambos por el que ascienden por capilaridad los distintos reactivos. Estos se eliminan después de cada incubación apoyando los portaobjetos sobre papeles de filtro.

Para el desarrollo de la técnica se siguió el siguiente protocolo, recomendado por el fabricante del equipo con ligeras modificaciones:

A) Preparación de la muestra:

- Incubar las preparaciones a 65°C durante 10 minutos para fundir la parafina.
- Desparafinar con Histolemon (4 x 1 minuto, t.a.).
- Rehidratar con alcohol absoluto (2 x 1 minuto, t.a.), alcohol de 96% (2 x 1 minuto, t.a.) y tampón de lavado pH 7.5 ("Immunoassay buffer", Biomedica Corp.) (2 lavados).

En el protocolo del equipo se recomienda utilizar una solución de lugol y ácido clorhídrico en alcohol de 95% en lugar de alcohol de 96%, pero en este caso no es necesario por no haberse utilizado fijadores que contengan mercurio.

En el caso de las líneas celulares, la técnica se inicia en este punto, lavando varias veces con el tampón de lavado.

- Bloquear la fosfatasa alcalina endógena con una solución de ácido crómico al 1% ("Redusol", Biomedica Corp.) (1 x 2 minutos a 40°C).
- Lavar con tampón (4 lavados).

B) Formación del complejo antígeno-anticuerpo:

- Anticuerpo anti-PV, 20 minutos a 40°C, en lugar de los 9 minutos recomendados por el fabricante del equipo.
- Lavar con tampón (2 lavados).

C) Detección del complejo antígeno-anticuerpo:

- Anticuerpo secundario polivalente biotinilado, 4 minutos a 40°C.

- Lavar con tampón (2 lavados).
- Avidina-fosfatasa alcalina, 4 minutos a 40°C.
- Lavar con tampón (2 lavados).
- Naftol fosfato (sustrato)/Fast red (cromógeno), 15 minutos a 40°C, en lugar de dos incubaciones de 10 minutos como recomienda el fabricante.
- Lavar con agua destilada (2 lavados).

D) Coloración de contraste y montaje de las preparaciones:

Para la realización de esta fase de la técnica no se siguió el protocolo ni se utilizaron los reactivos del equipo mencionado.

- Hematoxilina de Harris (Gurr), 1-4 minutos a t.a.
- Diferenciar con agua amoniacal, 15 segundos a t.a.
- Lavar con agua.
- Montar con glicerol-gelatina, previamente calentado a 60°C.

El resultado final es una coloración rojo brillante en los núcleos de las células positivas sobre un fondo de tonalidad azul muy clara debida a la tinción de contraste.

Por cada muestra se procesó simultáneamente un control negativo en el que el anticuerpo primario anti-PV se sustituyó por suero normal de conejo. Por cada serie se procesó un control positivo, utilizando cortes de una biopsia positiva por inmunohistoquímica para HPV.

Una biopsia se consideró positiva por inmunohistoquímica para el antígeno estructural común de HPV cuando se observó por lo menos un núcleo claramente positivo correspondiente a una célula del tercio superior del epitelio.

III.3.5. HIBRIDACION *IN SITU*.

Se realizaron dos técnicas distintas de hibridación *in situ* para detectar secuencias de ADN específicas de HPV:

1. **Técnica de detección (HIS-detección)**, realizada en condiciones relajadas de hibridación, para demostrar la presencia de secuencias de HPV en el tejido, sin especificar el tipo. Esta técnica se efectuó en todas las biopsias y en las tres líneas celulares.
2. **Técnica de tipado (HIS-tipado)**, realizada en condiciones estrictas de hibridación, para detectar secuencias específicas de los principales tipos de HPV genitales. Esta técnica se aplicó sólo a aquellas biopsias que dieron un resultado positivo por la técnica de detección y a las tres líneas celulares estudiadas.

III.3.5.1. Técnica de detección.

Se empleó un equipo comercial ("panHPV DISH kit", Kreotech Biotechnology), diseñado para la detección de ADN de HPV en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, en tejidos congelados y en muestras citológicas.

El equipo se basa en el empleo de un cóctel de sondas de ADN biotiniladas específicas de los principales tipos de HPV genitales en condiciones de hibridación relajadas, lo que permite detectar tanto secuencias de ADN de los tipos incluidos en el cóctel de sondas, como secuencias relacionadas. La

detección del híbrido sonda biotinilada-ADN diana se basa en el método estreptavidina-biotina-fosfatasa alcalina.

Para el desarrollo de la técnica se siguió el protocolo que se describe a continuación, que coincide con el recomendado por el fabricante, salvo algunas modificaciones que se señalan:

A) Preparación de la muestra:

- Desparafinar los cortes con Histolemon (3 x 15 minutos, t.a.).
- Rehidratar con alcohol absoluto (2 x 1 minuto, t.a.), alcohol de 90% (1 minuto, t.a.), alcohol de 70% (1 minuto, t.a.), alcohol de 50% (1 minuto, t.a.) y PBS pH 7.4 (5 minutos, t.a.).

En el caso de las líneas celulares, la técnica se inició en este punto, lavándolas en PBS pH 7.4 (3 x 3 minutos, t.a.).

- Digestión enzimática con pepsina/HCl:

a) Biopsias:

0.25% de pepsina en HCl 0.01 N durante 30 minutos a 37°C,
previa hidrólisis ácida con HCl 0.1 N durante 15 minutos a t.a.

b) Líneas celulares:

10 µg/ml de pepsina en HCl 0.01 N durante 10 minutos a 37°C.

- Deshidratar con alcohol de 50% (1 minuto, t.a.), alcohol de 70% (1 minuto, t.a.), alcohol de 90% (1 minuto, t.a.) y alcohol absoluto (2 x 1 minuto, t.a.) y dejar secar los portos al aire.

B) Hibridación:

- Incorporar la sonda (10 μ l) sobre cada corte y colocar encima un cubreobjetos, evitando la formación de burbujas.
- Desnaturalizar la sonda y el ADN del tejido por calentamiento, colocando las preparaciones sobre una placa calefactora a 95°C durante 5 minutos, en lugar de los 2 minutos a 90°C recomendados por el fabricante.
- Hibridar en estufa a 37°C durante 1 hora, en lugar de los 30 minutos recomendados por el fabricante.
- Retirar los cubreobjetos por inmersión en PBS pH 7.4 y efectuar los lavados de posthibridación con tampón citrato salino (1.5 mM de citrato, 15 mM de NaCl) sin formamida (3 x 5 minutos a 37°C).
- Lavar con PBS (2 x 2 minutos, t.a.).

C) Detección del híbrido:

- Retirar el exceso de tampón y añadir una solución de estreptavidina (0.8 μ g/ml) en PBS pH 7.4 + 3% de albúmina bovina (BSA) (30 minutos, t.a.).
- Lavar con PBS (2 x 3 minutos, t.a.).
- Retirar el exceso de tampón y añadir una solución de fosfatasa alcalina biotinilada (0.4 μ g/ml) en PBS pH 7.4 + 3% de BSA (30 minutos, t.a.).
- Lavar con PBS (2 x 3 minutos, t.a.).
- Retirar el exceso de tampón y añadir una solución de bromo-cloro-

indol fosfato (BCIP; sustrato) y azul de nitrotetrazolio (NBT; cromógeno) preparada de la siguiente forma: añadir 10 μ l de una solución de NBT (32 mg/ml) en dimetilformamida (DMF) al 70% + 10 μ l de una solución de BCIP (16 mg/ml) en DMF a 1 ml de tampón de tinción (TRIS-HCl 0.1 M pH 9.5, 0.1 M NaCl, 50 mM $MgCl_2$).

- Incubar en oscuridad a t.a., controlando con el microscopio la reacción de tinción, y nunca más de 2 horas. En nuestro experimento se obtuvieron buenos resultados con 30 minutos de incubación.
- Parar la reacción lavando los portaobjetos con grandes cantidades de PBS y a continuación con agua destilada.

D) Coloración de contraste y montaje de las preparaciones:

En esta fase de la técnica no se siguió el protocolo ni se utilizaron los reactivos del equipo mencionado. Se realizaron los mismos pasos descritos en la técnica de inmunohistoquímica.

El resultado final es una coloración violácea a negra en los núcleos de las células positivas sobre un fondo de tonalidad azul muy clara.

Por cada muestra se procesaron simultáneamente tres cortes: uno se trató con el cóctel de sondas biotiniladas; un control negativo, en el que la sonda específica para HPV fue sustituida por una sonda biotinilada específica para el plásmido pBR322; y un control positivo, en el que se utilizó una sonda específica de ADN humano (secuencia Alu 2, Biomeda Corp.).

Por cada serie se procesó un control positivo consistente en cortes de una biopsia en la que previamente se había confirmado la presencia de ADN de HPV.

Una biopsia se consideró positiva para HPV por HIS-detección cuando se observó por lo menos un núcleo claramente positivo.

III.3.5.2. Técnica de tipado.

Se utilizó el equipo comercial "PathoGene" (Enzo Diagnostics), diseñado para la detección de ADN de tipos de HPV de bajo riesgo (6 y 11), riesgo intermedio (31,33 y 51) y alto riesgo (16 y 18), en biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina. Concretamente se utilizaron tres sondas biotiniladas:

1. Cóctel de dos sondas de ADN biotiniladas específicas para los tipos 6 y 11 de HPV.
2. Cóctel de dos sondas de ADN específicas para los tipos 16 y 18 de HPV.
3. Cóctel de tres sondas de ADN específicas para los tipos 31, 33 y 51 de HPV.

A diferencia de la técnica de detección, la hibridación se realizó en condiciones estrictas, de manera que sólo se pudieran detectar las secuencias de ADN complementarias de las utilizadas en las sondas. La detección del híbrido se realizó por el método estreptavidina-biotina-peroxidasa.

A continuación se detalla el protocolo seguido para la realización de la técnica, que coincide con el recomendado por el fabricante del equipo, salvo pequeñas modificaciones que se señalan:

A) Preparación de la muestra:

- El desparafinado y la rehidratación de los cortes es igual al de la técnica de detección, excepto que se termina en agua destilada en lugar de PBS pH 7.4.
- Retirar el exceso de agua y dejar secar los cortes a t.a.

- Digestión enzimática con una solución de proteinasa K (250 μ g/ml) en tampón de lavado (10 mM PBS, 5 mM EDTA) (15 minutos a 37°C).
- Lavar con tampón de lavado (3 x 1 minuto, t.a.).
- Bloqueo de peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en tampón de lavado (10 minutos a 37°C).
- Lavar con tampón de lavado (1 minuto, t.a.).
- Deshidratar los cortes, igual que en la técnica de detección, y dejarlos secar al aire.

B) Hibridación:

- Añadir 40 μ l de cada sonda a sendos cortes y colocar encima un cubreobjetos, evitando la formación de burbujas.

En el caso de las líneas celulares, la técnica se inició directamente en este punto.

- Desnaturalizar la sonda y el ADN del tejido por calentamiento a 92°C durante 8 minutos en placa calefactora.
- Hibridar en estufa a 37°C durante 1 hora, en lugar de los 30 minutos recomendados por el fabricante.
- Retirar los cubreobjetos por inmersión en tampón de lavado y realizar un lavado de posthibridación con el tampón salino suministrado en el equipo, con un 50% de formamida (10 minutos a 37°C).
- Lavar con tampón de lavado (3 x 1 minuto, t.a.)

C) Detección del híbrido:

- Retirar el exceso de tampón e incubar con la solución de estreptavidina-peroxidasa biotinilada incluida en el equipo (15 minutos a 37°C).
- Lavar con tampón de lavado (3 x 1 minuto, t.a.).
- Retirar el exceso de tampón e incubar con una solución al 2% de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, cromógeno) en tampón acetato con 0.03% de peróxido de hidrógeno (sustrato) (15 minutos a 37°C).
- Lavar con tampón de lavado (3 x 1 minuto, t.a.) y agua destilada.

D) Coloración de contraste y montaje de las preparaciones:

Se siguió el mismo protocolo que en las técnicas anteriores.

El resultado final es una coloración roja de intensidad variable en los núcleos de las células positivas, sobre un fondo azul muy claro.

Por cada muestra se procesaron simultáneamente 5 cortes: uno para cada sonda de ADN de HPV, más los controles negativo y positivo descritos en la técnica de detección.

Por cada serie se procesó, como control positivo, un corte de un tejido en el que previamente se había confirmado la presencia de un tipo concreto de HPV.

Una biopsia se consideró positiva por hibridación *in situ* para un grupo de riesgo determinado de HPV cuando se observó por lo menos un núcleo claramente positivo en el corte incubado con la sonda correspondiente.

En todas las biopsias positivas, y con el fin de estudiar posibles parámetros con implicaciones pronósticas, se tuvieron en cuenta el tipo de marcaje obtenido, la distribución en el epitelio de las células positivas y la presencia o ausencia de

células positivas en los tercios superior, medio e inferior del epitelio.

III.3.6. DETECCION SIMULTANEA DE ANTIGENOS Y SECUENCIAS DE ADN ESPECIFICAS DE HPV.

A fin de obtener la máxima información de cada muestra se procedió al desarrollo y puesta a punto de una técnica de doble marcaje combinando inmunohistoquímica e hibridación in situ, para detectar simultáneamente antígenos de la cápside del virus y secuencias de ADN específicas de HPV.

La técnica se realizó sobre cortes de 5 μm montados en portaobjetos pretratados con un adhesivo no catiónico derivado del silano ("Biobond", BioCell Research Laboratories) y se utilizaron secuencialmente el anticuerpo y las sondas utilizadas en las técnicas de inmunohistoquímica y de HIS-tipado para HPV, respectivamente.

Dado que es una técnica de diseño propio, a continuación se describe pormenorizadamente:

A) Inmunohistoquímica:

- Desparafinar y rehidratar los cortes con alcoholes de graduación decreciente hasta agua.
- Bloqueo de uniones inespecíficas con suero normal de cabra (BioCell Research Laboratories) (20 minutos, t.a.).
- Retirar el exceso de suero de cabra e incubar con anticuerpo policlonal de conejo prediluido anti-PV (Biogenex Laboratories) (30 minutos, t.a.).
- Lavar con tampón de lavado (0.1M Tris, 0.15M NaCl, 1% BSA, 0.1%

tween 20, 0.01% gelatina, pH=8.2) (3 x 5 minutos, t.a.).

- Incubar con anticuerpo secundario de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado con partículas de oro coloidal de 5 nm (BioCell Research Laboratories), diluido 1/50 en tampón de lavado (20 minutos, t.a.).
- Lavar con agua destilada en agitación (5 x 5 minutos, t.a.).
- Incubar con solución amplificadora de plata (BioCell Research Laboratories) a temperatura ambiente. El tiempo de amplificación se controla directamente por observación al microscopio, hasta obtener una coloración negra sin depósito inespecífico de plata. En nuestro caso este tiempo osciló alrededor de los 12 minutos.
- Lavar con abundante agua destilada.

A continuación se procede a realizar la técnica de hibridación *in situ* sobre estas mismas preparaciones.

B) Hibridación *in situ*:

Se utilizaron los mismos reactivos que en la técnica de tipado, y se siguió el mismo protocolo ya descrito, empezando por dejar secar los cortes a temperatura ambiente para realizar a continuación la digestión enzimática con proteinasa K.

Por cada muestra se procesó simultáneamente un control negativo que fue tratado con suero normal de conejo y una sonda de ADN biotinilada específica del plásmido pBR322.

III.2.7. ESTADISTICA.

Los hallazgos histopatológicos y los resultados de las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* se recogieron en un fichero de datos generado desde el programa dbase III plus y se analizaron con los paquetes estadísticos EPIINFO y EPISTAT. Se realizaron los siguientes estudios:

- Cálculo de porcentajes, siempre que el total fuese igual o superior a 6.
- Cálculo de la sensibilidad y especificidad de la inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en condilomas acuminados de cérvix uterino, así como de los valores predictivos positivo y negativo.
- Contraste de independencia entre dos variables mediante el análisis de tablas de contingencia (N x N) con el test de χ^2 . fijando el nivel de significación mínimo con unos límites de confianza del 95% , que corresponde a un valor de $p \leq 0.05$.
- Para estudiar las diferencias entre los distintos tipos de lesión los datos se agruparon en tablas de contingencia de 2 x 2 y se calculó el valor de χ^2 , aplicando la corrección de Yates en los casos necesarios, la razón de ventaja de riesgo u "Odds ratio" (OR), el intervalo de confianza de la OR de Cornfield al 95%, el riesgo relativo (RR) y el intervalo de confianza del RR al 95% según las series de Taylor.

IV. RESULTADOS

IV.1. CLASIFICACION DE LAS LESIONES.

Tras el estudio histopatológico de todas las muestras se obtuvieron los siguientes resultados, separados en muestras de vulva y cérvix uterino.

IV.1.1. BIOPSIAS DE VULVA.

Todas las piezas de vulva presentaron lesiones asociadas a HPV y se clasificaron en tres grupos:

A) Lesiones benignas:

- Condiloma acuminado (n=31).

B) Lesiones displásicas, con potencialidad de evolución maligna (n=6):

- VIN I (n=3).

- VIN II (n=3)

C) Lesiones invasivas:

- Carcinoma escamoso bien diferenciado (n=3).

En la tabla IV.1 y en las figuras IV.1 y IV.2 se detallan la clasificación y distribución porcentual de las biopsias de vulva según su procedencia, las lesiones diagnosticadas y el criterio histopatológico de compatibilidad con infección por HPV.

	<u>AVILA¹</u>	<u>SALAMANCA²</u>	<u>GUADALAJARA³</u>	<u>MADRID (CPF)⁴</u>	<u>TOTAL</u>
LESIONES BENIGNAS HPV (condiloma acuminado)	14	8	2	7	31
LESIONES DISPLASICAS	---	2	1	3	6
VIN I	---	1	---	2	3
Compatible HPV	---	---	---	2	2
No compatible HPV	---	1	---	---	1
VIN II	---	1	1	1	3
Compatible HPV	---	---	1	1	2
No compatible HPV	---	1	---	---	1
LESIONES INVASIVAS (Carcinoma escamoso bien diferenciado)	---	3	---	---	3
T O T A L	14	13	3	10	40

¹ Hospital de la Seguridad Social Nuestra Señora de Sonsoles de Avila.² Hospital Clínico Universitario de Salamanca.³ Centro de Orientación Familiar de Guadalajara.⁴ Centro Penitenciario Femenino de Madrid.**Tabla IV.I.** Clasificación de las biopsias de vulva según su procedencia y la lesión diagnosticada.

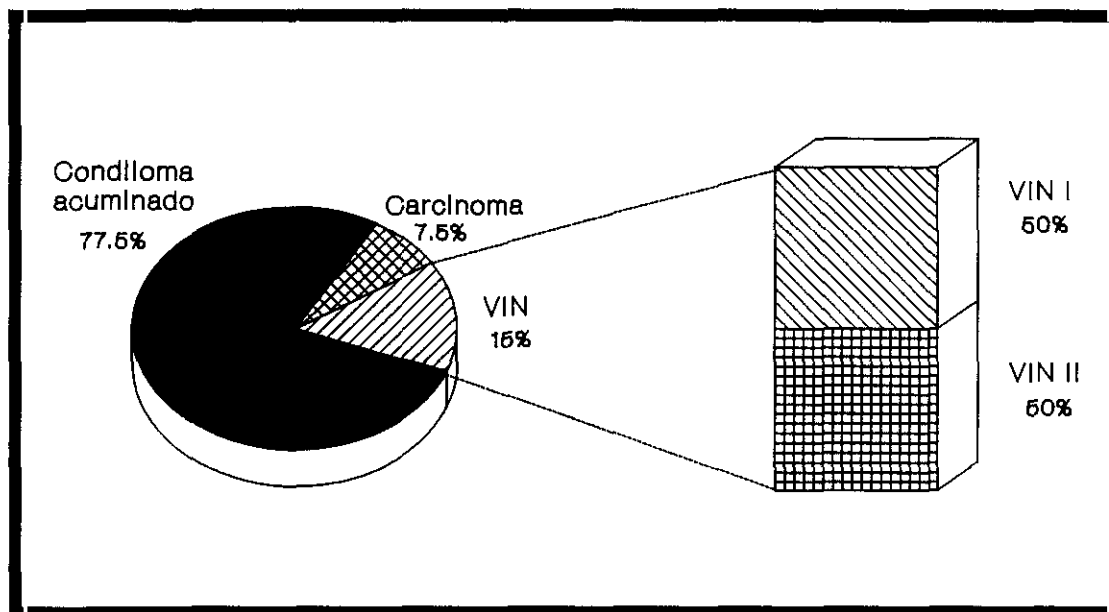


Figura IV.1. Distribución porcentual de los distintos tipos de lesión encontrados en las biopsias de vulva. (n=40).

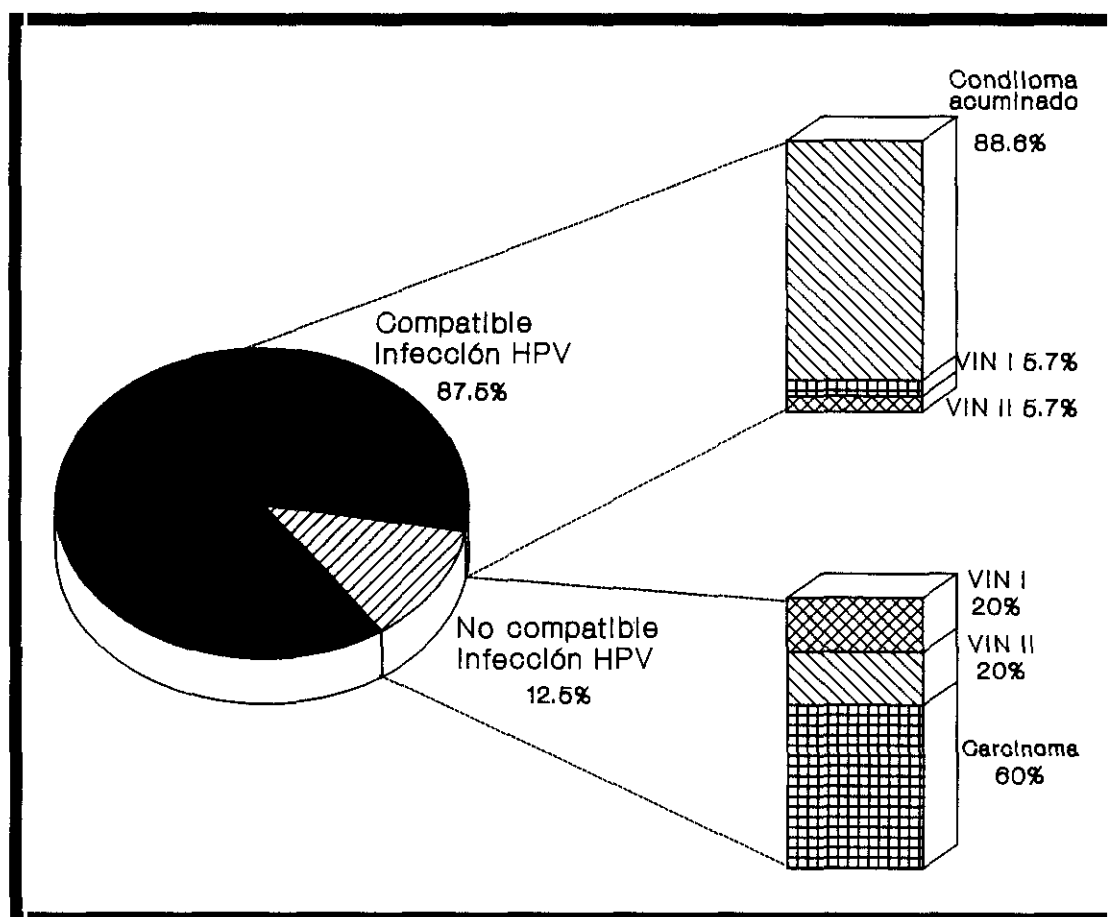


Figura IV.2. Distribución porcentual de las biopsias de vulva con hallazgos histopatológicos compatibles o no compatibles con infección por HPV según la lesión diagnosticada (n=40).

IV.1.2. BIOPSIAS DE CERVIX UTERINO.

Las biopsias de cérvix se clasificaron, según las lesiones encontradas, en dos grandes grupos:

A) Lesiones no asociadas a HPV (n=24):

- Hiperqueratosis (n=8).
- Cervicitis crónica (n=8).
- Pólipo cervical (n=8).

B) Lesiones asociadas a HPV (n=180):

1. Lesiones benignas:

- Condiloma acuminado (n=26).

2. Lesiones displásicas, con potencialidad de evolución maligna (n=142):

- LSIL (n=90).
- HSIL (n=52).

3. Lesiones invasivas:

- Carcinoma escamoso (n=12), dividido en bien diferenciado (n=9) y pobremente diferenciado (n=3).

En la tabla IV.II y en las figuras IV.3 y IV.4 se detallan la clasificación y distribución porcentual de las biopsias de cérvix uterino con lesiones asociadas a HPV según su procedencia, la lesión diagnosticada y el criterio histopatológico de compatibilidad con infección por HPV.

	<u>AVILA</u> ¹	<u>SALAMANCA</u> ²	<u>GUADALAJARA</u> ³	<u>MADRID (CPF)</u> ⁴	<u>MADRID (Av.)</u> ⁵	<u>TOTAL</u>
LESIONES BENIGNAS HPV (condiloma acuminado)	3	3	6	10	4	26
LESIONES DISPLASICAS	66	11	23	30	12	142
LSIL	39	5	17	24	5	90
Compatible HPV	34	4	16	24	5	83
No compatible HPV	5	1	1	---	---	7
HSIL	27	6	6	6	7	52
Compatible HPV	24	3	4	6	5	42
No compatible HPV	3	3	2	---	2	10
LESIONES INVASIVAS (Carcinoma escamoso)	2	10	---	---	---	12
Bien diferenciado	2	7	---	---	---	9
Pobremente dif.	---	3	---	---	---	3
T O T A L	71	24	29	40	16	180

¹ Hospital de la Seguridad Social Nuestra Señora de Sonsoles de Avila.² Hospital Clínico Universitario de Salamanca.³ Centro de Orientación Familiar de Guadalajara.⁴ Centro Penitenciario Femenino de Madrid.⁵ Centros de Salud del Ayuntamiento de Madrid.

Tabla IV.II. Clasificación de las biopsias de cérvix uterino con lesiones asociadas a HPV, según su procedencia.

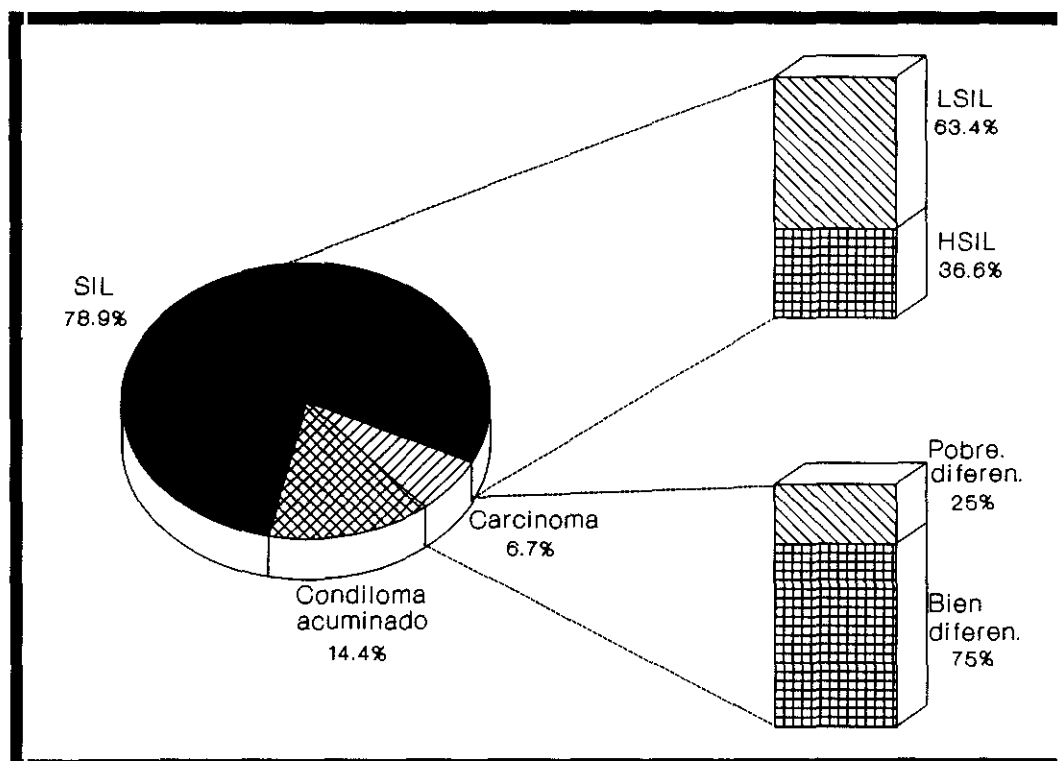


Figura IV.3. Distribución porcentual de las lesiones asociadas a HPV diagnosticadas en biopsias de cérvix uterino (n=180).

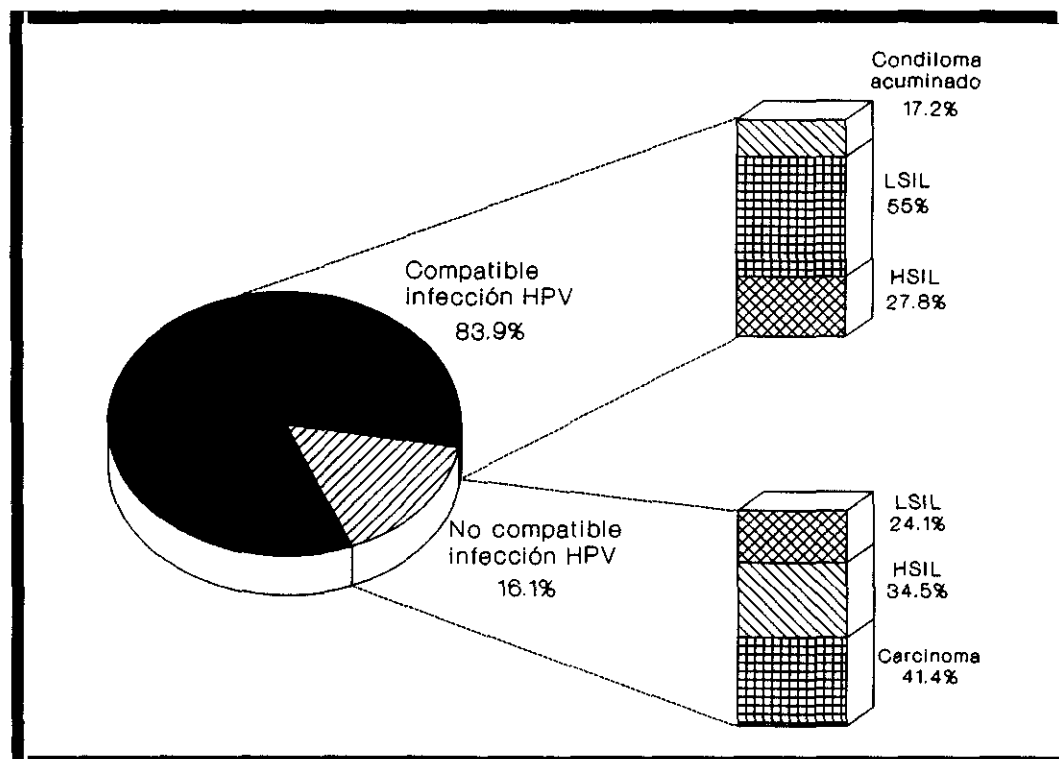


Figura IV.4. Distribución porcentual de lesiones cervicales con hallazgos histopatológicos compatibles o no compatibles con infección por HPV (n=180).

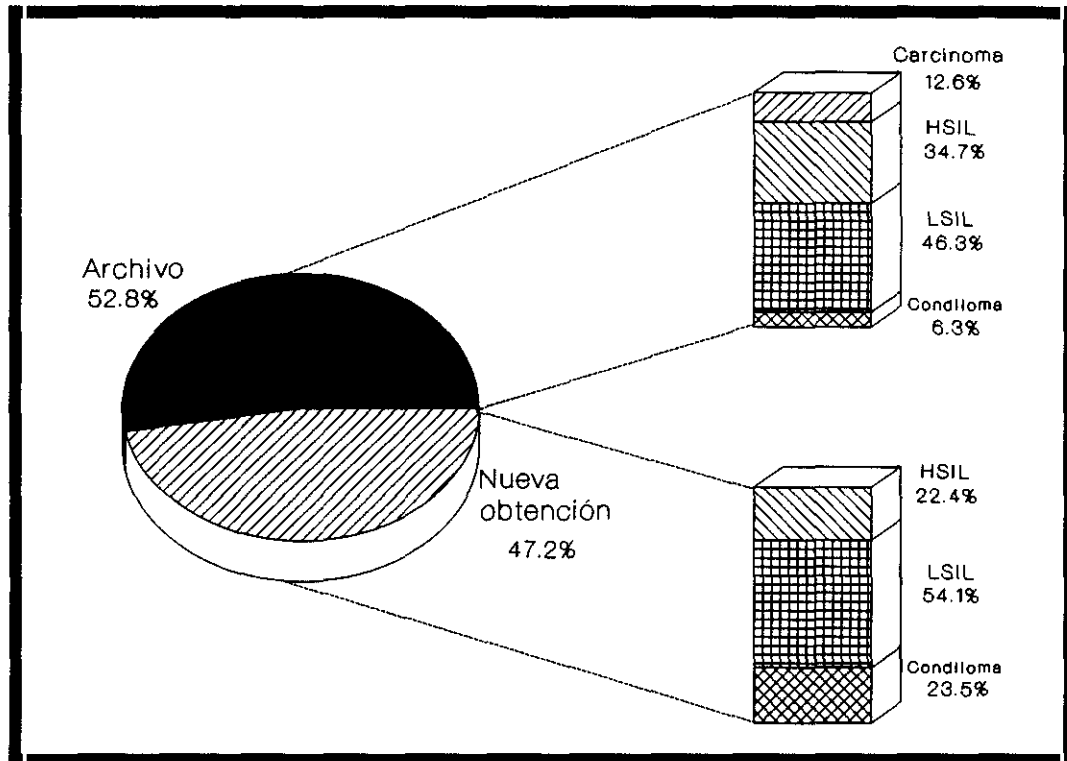


Figura IV.5. Distribución porcentual por lesiones de las biopsias de cérvix uterino según que procedan de archivo o sean de nueva obtención (n=180).

En la figura IV.5 se ilustra porcentualmente la clasificación de las biopsias cervicales con lesiones asociadas a HPV según que las muestras sean de archivo o de nueva obtención.

IV.2. LONGITUD DE EPITELIO.

Las 229 piezas en las que se midió la longitud del epitelio con análisis de imagen se dividieron en dos grupos:

A) Biopsias con lesiones no asociadas a HPV (n=24):

La longitud del epitelio fue superior a 10 mm en todas las piezas.

B) Biopsias con lesiones asociadas a HPV (n=205):

Los resultados obtenidos se detallan en la tabla IV.III. En las tablas IV.IV y IV.V se resume la clasificación de las biopsias de vulva y cérvix según su longitud de epitelio, en relación con las lesiones diagnosticadas.

LONGITUD DE EPITELIO (MM)	BIOPSIA	
	VULVA (n=37)	CERVIX (n=168)
<2	---	9 (5.4%)
2-3	1 (2.7%)	15 (8.9%)
3-4	1 (2.7%)	11 (6.6%)
4-5	---	15 (8.9%)
5-6	1 (2.7%)	15 (8.9%)
6-7	2 (5.4%)	11 (6.6%)
7-8	7 (18.9%)	7 (4.2%)
8-9	4 (10.8%)	14 (8.3%)
9-10	2 (5.4%)	10 (6.0%)
>10	19 (51.4%)	61 (36.3%)

Tabla IV.III. Clasificación de las biopsias de vulva y cérvix con lesiones no invasivas asociadas a HPV, según la longitud de su epitelio.

LONGITUD DE EPITELIO (mm)	LESION		
	Condiloma (n=31)	VIN I (n=3)	VIN II (n=3)
<2	---	---	---
2-3	1 (3.2%)	---	---
3-4	1 (3.2%)	---	---
4-5	---	---	---
5-6	---	1	---
6-7	2 (6.5%)	---	---
7-8	5 (16.1%)	---	2
8-9	4 (12.9%)	---	---
9-10	1 (3.2%)	1	---
>10	17 (54.8%)	1	1

Tabla IV.IV. Clasificación de las biopsias de vulva en relación con las lesiones no invasivas diagnosticadas y la longitud de epitelio.

LONGITUD DE EPITELIO (mm)	LESION		
	Condiloma (n=26)	LSIL (n=90)	HSIL (n=52)
<2	---	7 (7.8%)	2 (3.8%)
2-3	1 (3.8%)	4 (4.4%)	4 (7.7%)
3-4	2 (7.7%)	2 (2.2%)	5 (9.6%)
4-5	---	20 (22.2%)	3 (5.8%)
5-6	1 (3.8%)	9 (10.0%)	5 (9.6%)
6-7	3 (11.5%)	5 (5.6%)	3 (5.8%)
7-8	1 (3.8%)	4 (4.4%)	2 (3.8%)
8-9	2 (7.7%)	5 (5.6%)	7 (13.5%)
9-10	3 (11.5%)	3 (3.3%)	4 (7.7%)
>10	13 (50.0%)	31 (34.4%)	17 (32.7%)

Tabla IV.V. Clasificación de las biopsias de cérvix uterino en relación con las lesiones no invasivas asociadas a HPV diagnosticadas y la longitud de epitelio.

En los casos diagnosticados de carcinoma, tanto en vulva como en cérvix, y dada la naturaleza invasiva de este tipo de lesión, no pudo medirse la longitud del epitelio, al no estar conservada la capa basal de células. Sin embargo, todas las piezas tenían una cantidad de epitelio suficientemente representativa (más de 7 campos de 100 aumentos), equivalente a una longitud superior a 10 mm en las demás lesiones (el diámetro de un campo de 100 aumentos en el microscopio utilizado es de 1.6 mm).

IV.3. INMUNOHISTOQUIMICA.

Las tres líneas celulares estudiadas dieron un resultado negativo por inmunohistoquímica para el antígeno estructural común de HPV.

Todas las biopsias con lesiones no asociadas a HPV dieron igualmente un resultado negativo con esta técnica.

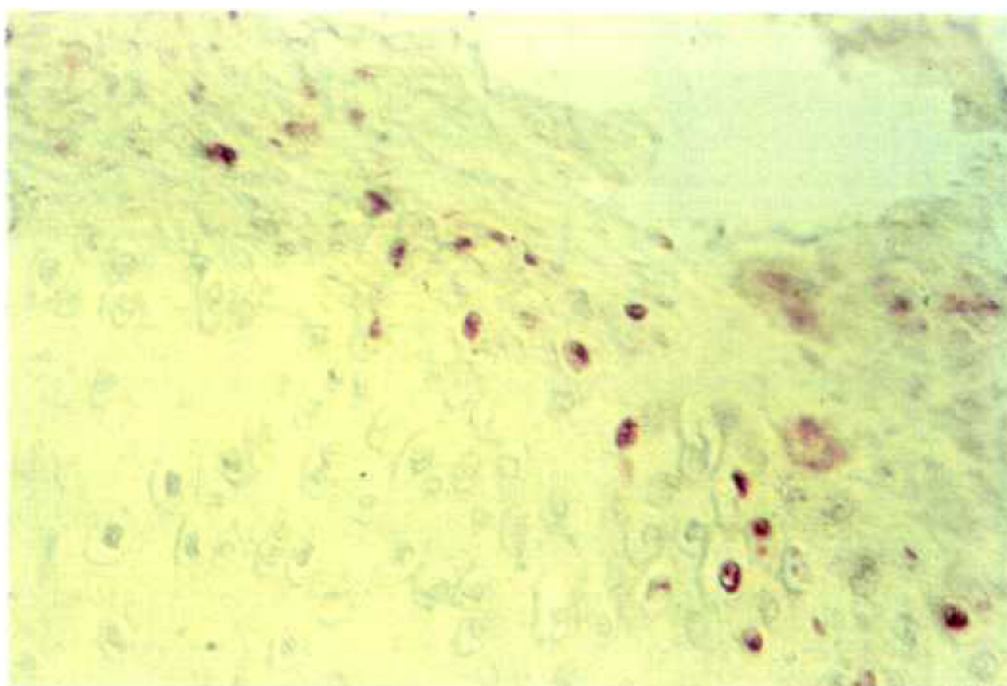


Figura IV.6. Condiloma acuminado de vulva positivo para HPV por inmunohistoquímica. El marcaje (núcleos de color rojo) afecta sólo a células superficiales del epitelio. (x 320).

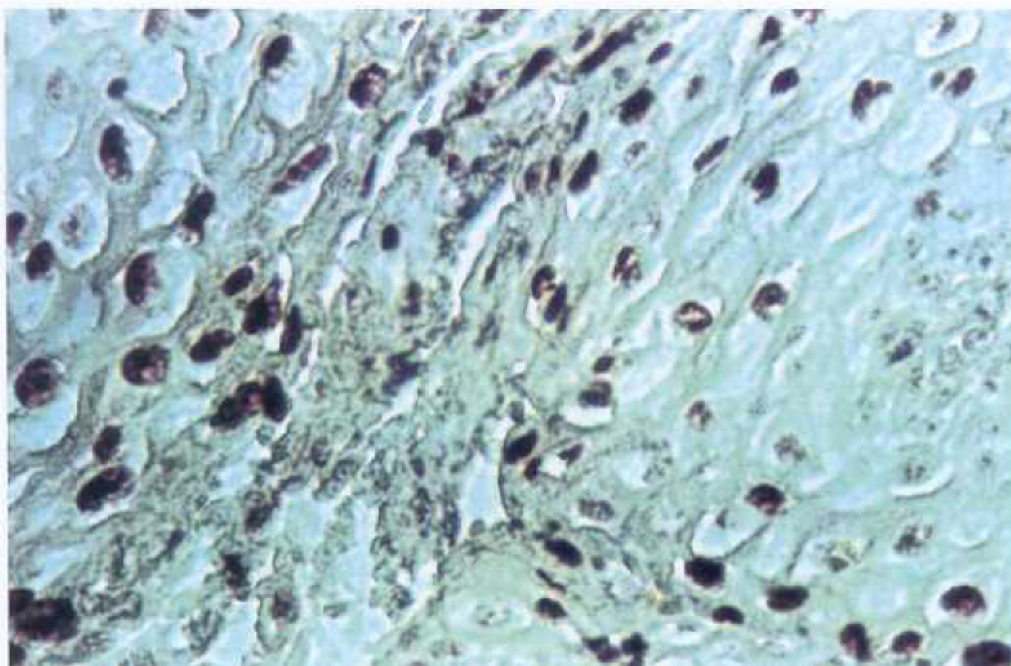


Figura IV.7. Detalle de coilocitos con reacción positiva para HPV por inmunohistoquímica (núcleos de color rojo). (x 640).

Por lo que respecta a las piezas con lesiones asociadas a HPV, se obtuvo un resultado positivo en 52 biopsias (23.6%). En todos los casos el marcaje afectó de forma casi exclusiva a coilocitos y células disqueratóticas, situadas siempre en el tercio superior del epitelio (figs. IV.6 y IV.7).

Para tabular los resultados obtenidos por lesiones conviene distinguir entre piezas de vulva y de cérvix uterino.

IV.3.1. BIOPSIAS DE VULVA.

De las 40 biopsias estudiadas, 21 fueron positivas para HPV por inmunohistoquímica (52.5%). La distribución de los casos positivos por lesiones se especifica en la tabla IV.VI.

	Condiloma (n=31)	VIN I (n=3)	VIN II (n=3)	Carcinoma (n=3)	Total (n=40)
Positivo	18 (58.1%)	1	1	1	21 (52.5%)
Negativo	13 (41.9%)	2	2	2	19 (47.5%)

Tabla IV.VI. Resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica para HPV en biopsias de vulva, según las distintas lesiones.

En la biopsia diagnosticada de carcinoma epidermoide la reacción positiva se observó en dos células superficiales de una región de epitelio displásico adyacente a la masa tumoral.

IV.3.2. BIOPSIAS DE CERVIX UTERINO.

De los 180 casos estudiados, 30 fueron positivos para HPV por inmunohistoquímica (16.7%). En la tabla IV.VII se especifican los resultados obtenidos por lesiones y su distribución porcentual.

	Condiloma (n=26)	LSIL (n=90)	HSIL (n=52)	Carcinoma (n=12)	Total (n=180)
Positivo	14 (53.8%)	10 (11.1%)	6 (11.5%)	---	30 (16.7%)
Negativo	12 (46.2%)	80 (88.9%)	46 (88.5%)	12 (100%)	150 (83.3%)

Tabla IV.VII. Resultados obtenidos con la técnica de inmunohistoquímica para HPV en biopsias de cérvix uterino con lesiones asociadas a HPV.

Si se consideran sólo las biopsias con lesiones no asociadas a HPV y aquellas diagnosticadas de condiloma acuminado, la inmunohistoquímica tiene, con respecto a los criterios histológicos, una sensibilidad de 53.8%, 100% de especificidad, un valor predictivo positivo de 100% y un valor predictivo negativo de 66.7%.

IV.4. HIBRIDACION *IN SITU*.

IV.4.1. TECNICA DE DETECCION.

Las líneas celulares CaSki y HeLa dieron resultado positivo por esta técnica. En las células CaSki la positividad consistió en un marcaje de tipo puntual de color violáceo en el núcleo de las células, variando el número de puntos y su tamaño de unas células a otras, llegando a ocupar en algunas ocasiones la casi totalidad del núcleo (fig. IV.8). En las células HeLa, en cambio, la positividad consistió en uno o dos puntos pequeños intranucleares (fig. IV.9).

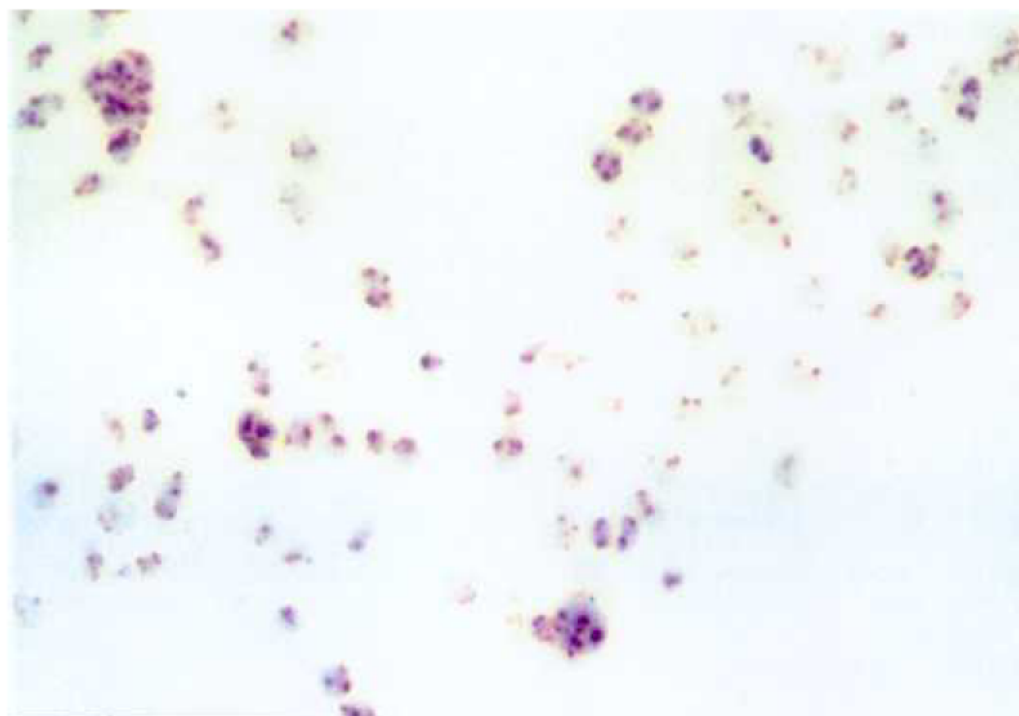


Figura IV.8. Extensión de células CaSki positivas para HPV por HIS-detección. (x 320).

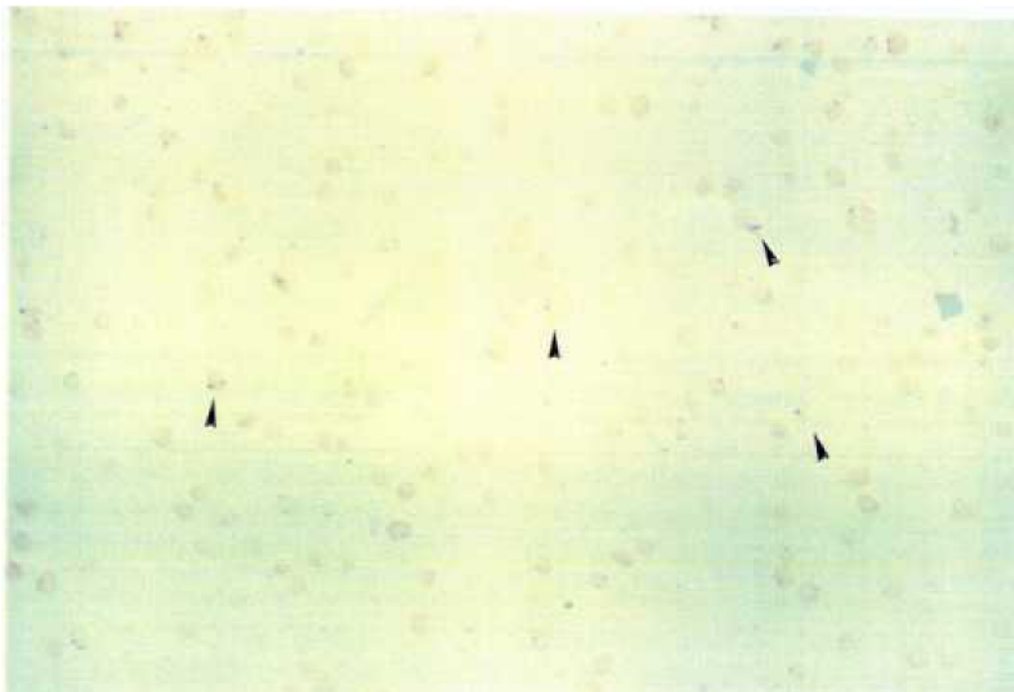


Figura IV.9. Extensión de células HeLa con una reacción positiva para HPV por HIS-detección, consistente en uno o dos puntos morados intranucleares (flechas). (x 160).

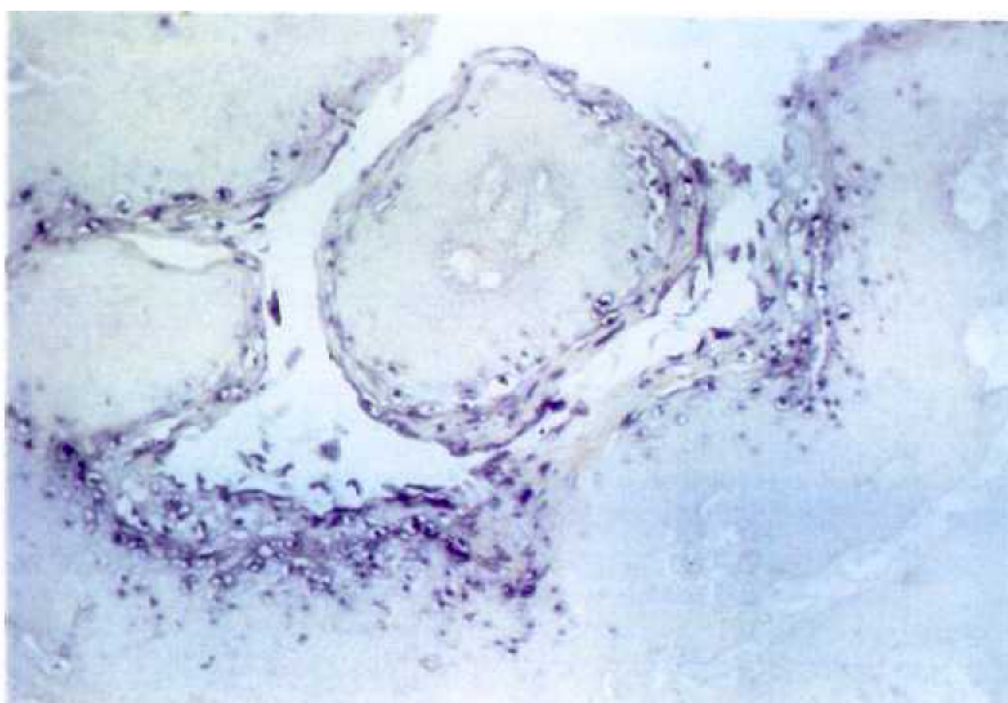


Figura IV.10. Condiloma acuminado de vulva positivo para HPV por HIS-detección. Los núcleos de las células positivas presentan una intensa coloración violácea.

Las células SiHa fueron negativas con la técnica de HIS-detección, al igual que todas las biopsias cervicales con lesiones no asociadas a HPV.

Por lo que respecta a las piezas con lesiones asociadas a HPV, 155 (70.5%) fueron positivas (fig. IV.10). Los resultados por lesiones se detallan a continuación, divididos en vulva y cérvix.

IV.4.1.1. Biopsias de vulva.

Treinta y tres biopsias de las 40 estudiadas resultaron positivas para HPV por HIS-detección (82.5%). Los resultados obtenidos por lesiones se especifican en la tabla IV.VIII.

	Condiloma (n=31)	VIN I (n=3)	VIN II (n=3)	Carcinoma (n=3)	Total (n=40)
Positivo	25 (80.7%)	2	3	3	33 (82.5%)
Negativo	6 (19.4%)	1	---	---	7 (17.5%)

Tabla IV.VIII. Resultados obtenidos con la técnica de HIS-detección para HPV en biopsias de vulva.

IV.4.1.2. Biopsias de cérvix uterino.

De las 180 biopsias estudiadas, 122 resultaron positivas con la técnica de HIS-detección (67.8%). La distribución de las biopsias positivas por lesiones se detalla en la tabla IV.IX.

	Condiloma (n=26)	LSIL (n=90)	HSIL (n=52)	Carcinoma (n=12)	Total (n=180)
Positivo	24 (92.3%)	47 (52.2%)	40 (76.9%)	11 (91.7%)	122 (67.8%)
Negativo	2 (7.7%)	43 (47.8%)	12 (23.1%)	1 (8.3%)	58 (32.2%)

Tabla IV.IX. Resultados obtenidos con la técnica de HIS-detección para HPV en biopsias cervicales con lesiones asociadas a HPV.

La sensibilidad de esta técnica respecto de los criterios histopatológicos en biopsias diagnosticadas de condiloma acuminado es de 92.3%, la especificidad y el valor predictivo positivo de 100% y el valor predictivo negativo de 92.3%.

IV.4.1.3. Relación entre la técnica de HIS-detección para HPV y la longitud del epitelio presente en las biopsias.

En la tabla IV.X y en la figura IV.11 se detallan los resultados globales obtenidos en biopsias de vulva y cérvix con lesiones no invasivas asociadas a HPV en relación con la longitud del epitelio presente en las mismas. En la tabla IV.XI y en la figura IV.12 se representan estos mismos resultados en biopsias cervicales desglosados por lesiones.

En la figura IV.13 se ilustran los resultados porcentuales obtenidos con esta técnica en biopsias de cérvix, con una longitud de epitelio inferior a 5 mm, entre 5 y 9 mm y superior a 9 mm. Las diferencias entre estos tres porcentajes de positividad son estadísticamente significativas ($p < 10^{-6}$) cuando se consideran globalmente. La diferencia es también significativa entre las biopsias con menos de 5 mm de epitelio y aquellas con epitelio entre 5 y 9 mm ($p < 0.0002$) o superior a 9 mm ($p < 10^{-6}$). Por el contrario, no es significativa la diferencia entre los resultados obtenidos en biopsias con un epitelio comprendido entre 5 y 9 mm y aquellas con más de 9 mm.

LONGITUD DE EPITELIO (mm)	BIOPSIA	
	VULVA (HIS + ¹ / total ²)	CERVIX (HIS + ¹ / total ²)
<2	--- / ---	1 / 9
2-3	--- / 1	6 / 15
3-4	--- / 1	4 / 11
4-5	--- / ---	6 / 15
5-6	1 / 1	12 / 15
6-7	2 / 2	8 / 11
7-8	7 / 7	4 / 7
8-9	2 / 4	10 / 14
9-10	1 / 2	8 / 10
>10	17 / 19	52 / 61

¹ Número de biopsias positivas por la técnica de HIS-detección para HPV.

² Número total de biopsias incluidas en cada clase según la longitud de su epitelio.

Tabla IV.X. Resultados obtenidos con la técnica de HIS-detección para HPV en biopsias de vulva y cérvix en relación con la longitud de su epitelio.

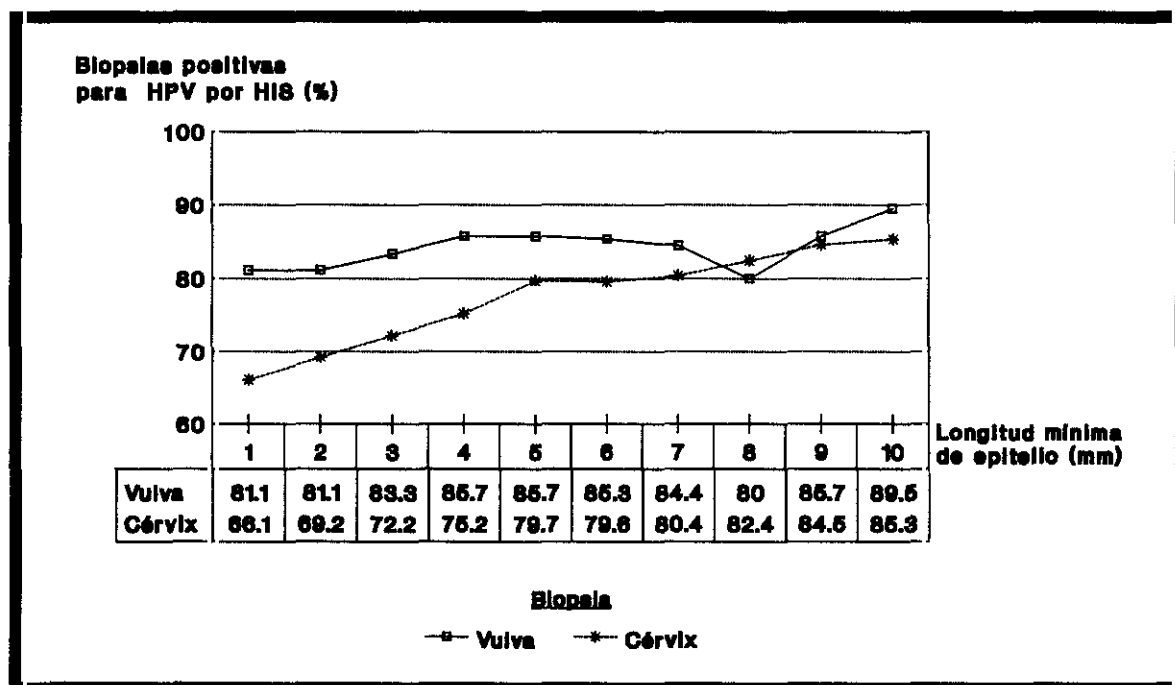


Figura IV.11. Resultados obtenidos con la técnica de HIS-detección en biopsias de vulva y cérvix con lesiones no invasivas asociadas a HPV según el tamaño mínimo de las mismas.

LONGITUD DE EPITELIO (mm)	BIOPSIA		
	CONDILOMA (HIS + ¹ / total ²)	LSIL (HIS + ¹ / total ²)	HSIL (HIS + ¹ / total ²)
<2	--- / ---	1 / 7	--- / 2
2-3	--- / 1	3 / 4	3 / 4
3-4	2 / 2	--- / 2	2 / 5
4-5	--- / ---	4 / 20	2 / 3
5-6	1 / 1	7 / 9	4 / 5
6-7	3 / 3	4 / 5	1 / 3
7-8	1 / 1	1 / 4	2 / 2
8-9	2 / 2	3 / 5	5 / 7
9-10	3 / 3	1 / 3	4 / 4
>10	12 / 13	23 / 31	17 / 17

¹ Número de biopsias positivas por la técnica de HIS-detección para HPV.

² Número total de biopsias incluidas en cada clase según la longitud de su epitelio.

Tabla IV.XI. Resultados obtenidos con la técnica de HIS-detección para HPV en biopsias cervicales en relación con la longitud de su epitelio y la lesión diagnosticada.

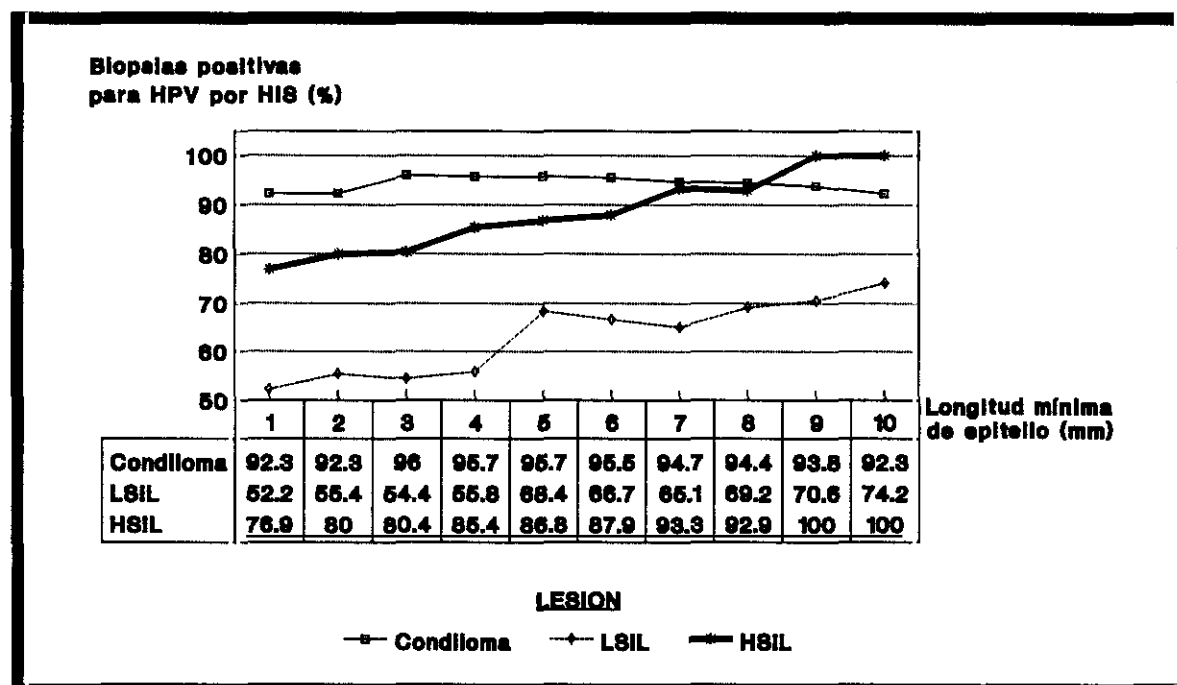


Figura IV.12. Resultados obtenidos con la técnica de HIS-detección en biopsias cervicales con lesiones no invasivas asociadas a HPV, según longitudes mínimas de epitelio.

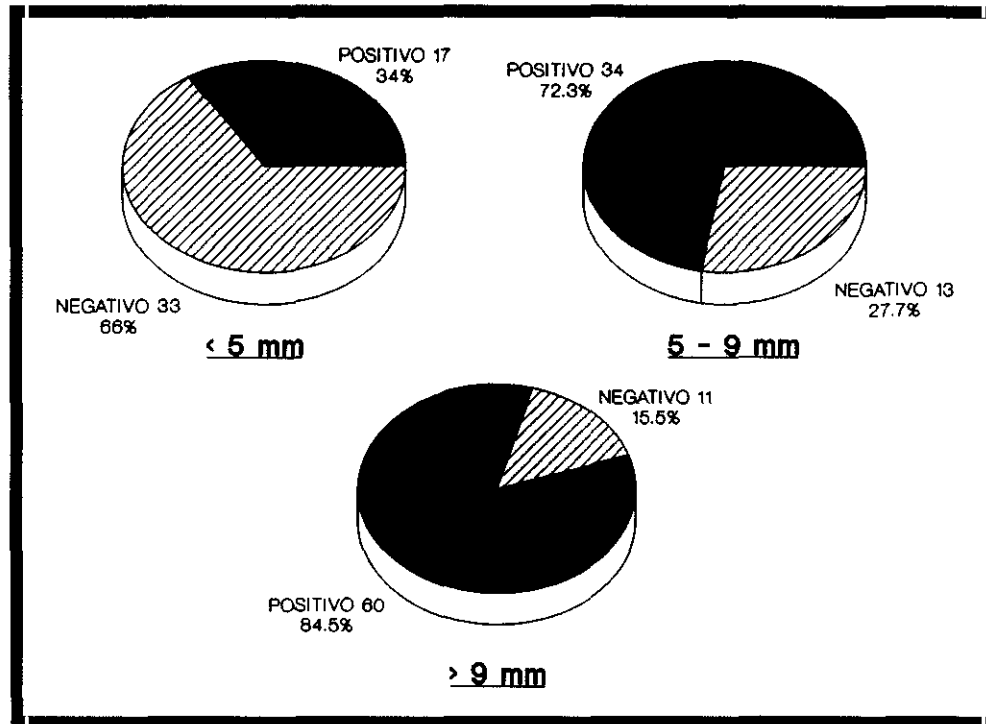


Figura IV.13. Resultados porcentuales obtenidos con la técnica de HIS-detección para HPV en biopsias de cérvix con una longitud de epitelio inferior a 5 mm, entre 5 y 9 mm y superior a 9 mm.

Finalmente, en la figura IV.14 se comparan los porcentajes de positividad para HPV por hibridación *in situ* en las distintas lesiones no invasivas diagnosticadas en piezas de cérvix según que la longitud del epitelio presente en las mismas sea inferior a 5 mm, esté comprendida entre 5 y 9 mm o sea superior a 9 mm. Las diferencias observadas en condilomas acuminados no son estadísticamente significativas. Sí lo son, en cambio, en LSIL ($p < 0.0003$) y HSIL ($p < 0.003$) cuando se consideran globalmente. En LSIL la diferencia es significativa entre biopsias con menos de 5 mm de epitelio y aquellas con 5-9 mm o más de 9 mm; no es significativa entre biopsias con 5-9 mm de epitelio y más de 9 mm. En HSIL hay diferencia estadísticamente significativa entre biopsias con menos de 5 mm y más de 9 mm y entre biopsias con 5-9 mm y más de 9 mm; no es significativa la diferencia observada entre biopsias con menos de 5 mm y con 5-9 mm de epitelio.

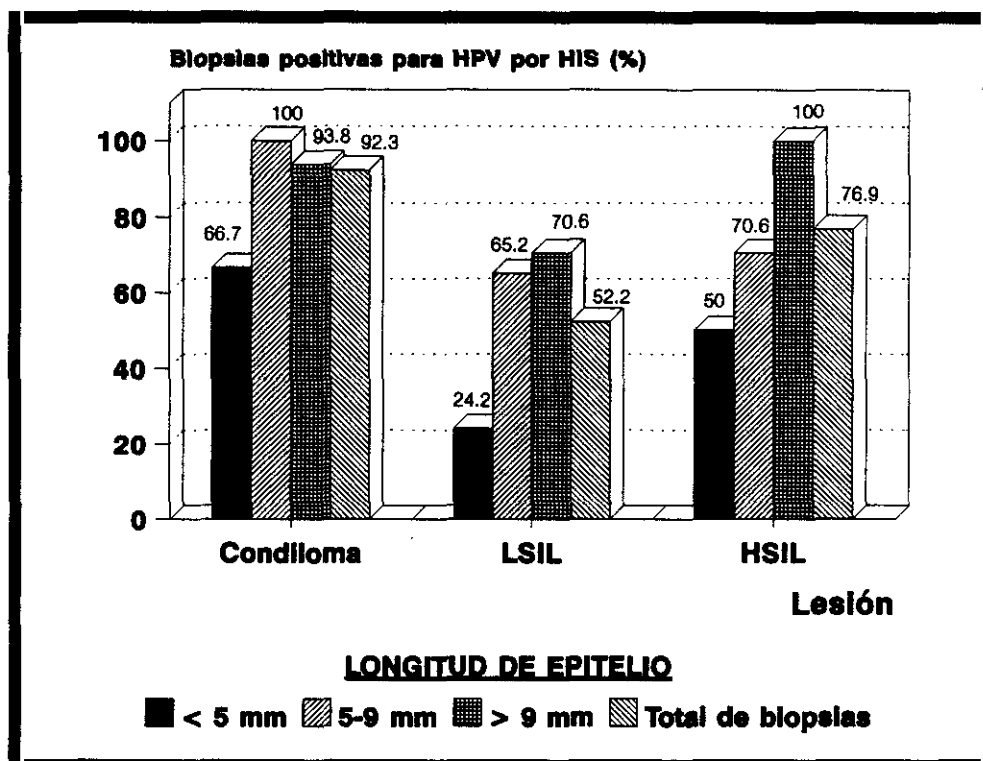


Figura IV.14. Comparación de resultados de la técnica de HIS-detección para HPV por lesiones en biopsias de cérvix con longitud de epitelio menor de 5 mm, entre 5-9 mm y mayor de 9 mm.

IV.4.2. TECNICA DE TIPADO.

Las dos líneas celulares positivas por la técnica de HIS-detección (CaSki y HeLa) dieron un resultado positivo con la sonda específica para los tipos 16/18 de HPV. El tipo de marcaje observado en cada una de ellas fue similar al obtenido por HIS-detección. Ambas líneas celulares fueron negativas con las sondas específicas para los tipos 6/11 y 31/33/51 de HPV.

Por lo que respecta a los resultados obtenidos en las biopsias positivas por HIS-detección, conviene separar nuevamente las biopsias de vulva y cérvix.

IV.4.2.1. Biopsias de vulva.

De las 33 biopsias HPV positivas por la técnica de detección, 25 fueron positivas para los tipos 6/11 de HPV (75.8%), 3 para los tipos 16/18 de HPV (9.1%), 6 para los tipos 31/33/51 de HPV (18.2%) y 3 resultaron negativas para las tres sondas (9.1%). En la tabla IV.XII se muestran los resultados por lesiones.

LESION	TIPO VIRAL			
	6/11	16/18	31/33/51	Otros
Condiloma (n=25)	23	2	3	1
VIN I (n=2)	1	1	---	---
VIN II (n=3)	1	---	2	---
Carcinoma (n=3)	---	---	1	2

Tabla IV.XII. Resultados obtenidos con la técnica de HIS-tipado en biopsias de vulva HPV-positivas en relación con las lesiones diagnosticadas.

Tres biopsias dieron un resultado positivo con más de una sonda (7.5% del total de muestras de vulva estudiadas y 9.1% de las biopsias positivas por HIS-detección): una fue positiva para los tipos 6/11 y 16/18 de HPV, otra para los tipos 6/11 y 31/33/51 de HPV y la tercera dio un resultado positivo con las tres sondas utilizadas. Los tres casos habían sido diagnosticados de condiloma acuminado y en todos ellos el marcaje obtenido con cada sonda afectó a zonas distintas del epitelio no superpuestas.

IV.4.2.2. Biopsias de cérvix uterino.

De las 122 biopsias en las que se obtuvo un resultado positivo con HIS-detección, 34 fueron positivas para los tipos 6/11 de HPV con la técnica de HIS-

tipado (27.9%), 40 para los tipos 16/18 de HPV (32.8%), 51 para los tipos 31/33/51 de HPV (41.8%) y 9 fueron negativos para las tres sondas (7.4%).

En 10 piezas (1 condiloma acuminado, 6 LSIL y 3 HSIL) se obtuvo un resultado positivo con 2 sondas (5.6% del total de biopsias de cérvix y 8.2% de las biopsias positivas por HIS-detección): 1 (LSIL) fue positiva para los tipos 6/11 y 16/18 de HPV, 4 (1 condiloma acuminado y 3 LSIL) para los tipos 6/11 y 31/33/51 de HPV y 5 (2 LSIL y 3 HSIL) para los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV. Una biopsia, diagnosticada de LSIL, dio un resultado positivo con las tres sondas. En todos estos casos el marcaje obtenido con cada sonda afectó a zonas distintas del epitelio no superpuestas.

En la tabla IV.XIII y en la figura IV.15 se muestran los resultados obtenidos con esta técnica, por lesiones, en el total de biopsias cervicales HPV-positivas por HIS-detección. Finalmente, en la tabla IV.XIV se detallan estos mismos resultados eliminando aquellas biopsias que fueron positivas para dos o más sondas.

LESION	TIPO VIRAL			
	6/11	16/18	31/33/51	Otros
Condiloma (n=24)	17	---	8	---
LSIL (n=47)	13	16	21	5
HSIL (n=40)	4	20	16	3
Carcinoma (n=11)	---	4	6	1

Tabla IV.XIII. Resultados obtenidos con la técnica de HIS-tipado en biopsias cervicales HPV-positivas en relación con las lesiones diagnosticadas.

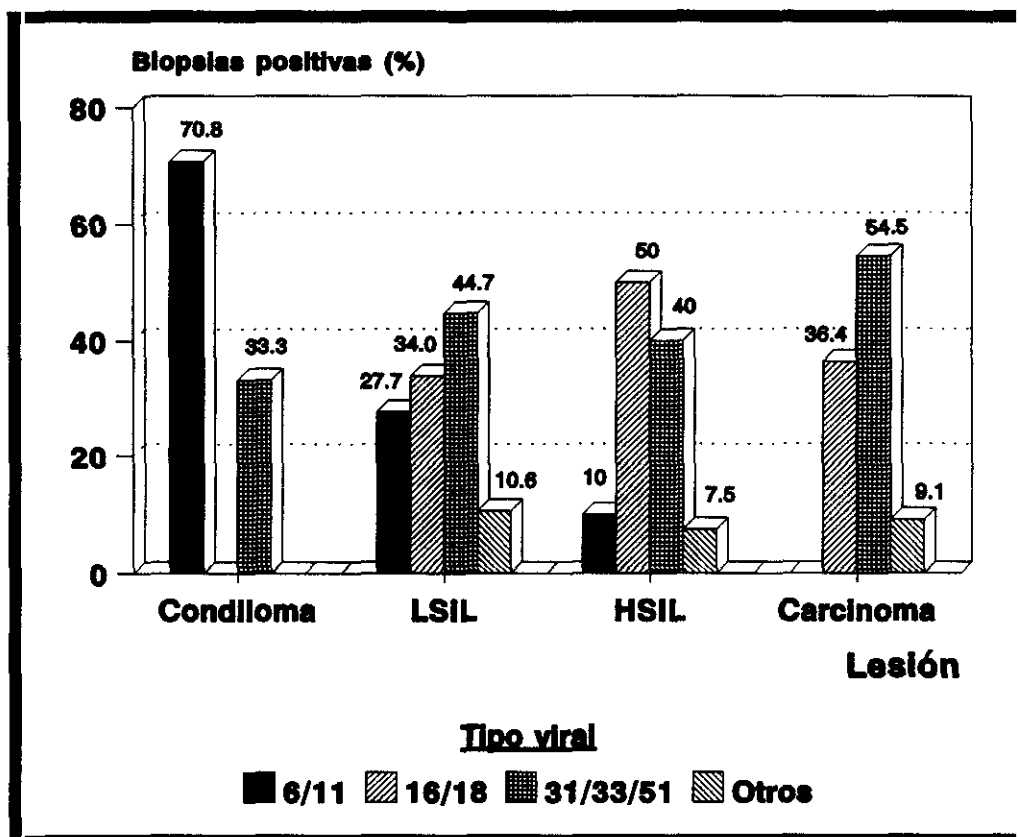


Figura IV.15. Representación gráfica de los resultados porcentuales obtenidos con la técnica de HIS-tipado en biopsias de cérvix, por lesiones.

LESION	TIPO VIRAL			
	6/11	16/18	31/33/51	Otros
Condiloma	16	---	7	---
LSIL	8	12	15	5
HSIL	4	17	13	3
Carcinoma	---	4	6	1

Tabla IV.XIV. Resultados de la técnica de HIS-tipado para HPV, por lesiones, en biopsias cervicales sin infección múltiple.

La prueba de χ^2 para probar la hipótesis de independencia de estas dos variables (tipo viral y lesión), aplicada a los datos de la tabla IV.XIV, refleja una diferencia estadísticamente significativa ($p < 2 \times 10^{-5}$) entre los resultados obtenidos en cada tipo de lesión.

IV.5. PARAMETROS MORFOLOGICOS ASOCIADOS A LA HIBRIDACION *IN SITU*.

Para la evaluación de los tres parámetros morfológicos asociados a la hibridación *in situ* que se han estudiado, sólo se consideraron las biopsias que dieron resultado positivo con una única sonda por HIS-tipado y aquellas positivas por HIS-detección y negativas por HIS-tipado. En consecuencia, el número total de biopsias consideradas ha sido de 141: 30 de vulva y 111 de cérvix uterino.

IV.5.1. PATRON DE MARCAJE.

A nivel celular se observaron dos tipos distintos de reacción positiva con la técnica de hibridación *in situ*: uniforme, de manera que la coloración afecta por igual a la totalidad del núcleo (fig. IV.16), o puntual, de manera que el color se distribuye en forma de puntos variables en número y tamaño (fig. IV.17).

Según el tipo de reacción positiva predominante en cada biopsia HPV-positiva por hibridación *in situ* se distinguieron tres patrones de marcaje:

1. Uniforme: predominan las células positivas con una reacción de tipo uniforme y ,normalmente, de gran intensidad (fig. IV.16).
2. Puntual: la mayoría de las células positivas presentan una reacción de tipo puntual, independientemente del número, tamaño e intensidad de los puntos de color en cada núcleo (fig. IV.17).
3. Mixto: se observan células positivas con ambos tipos de marcaje, uniforme y puntual, en proporciones similares (fig. IV.18).

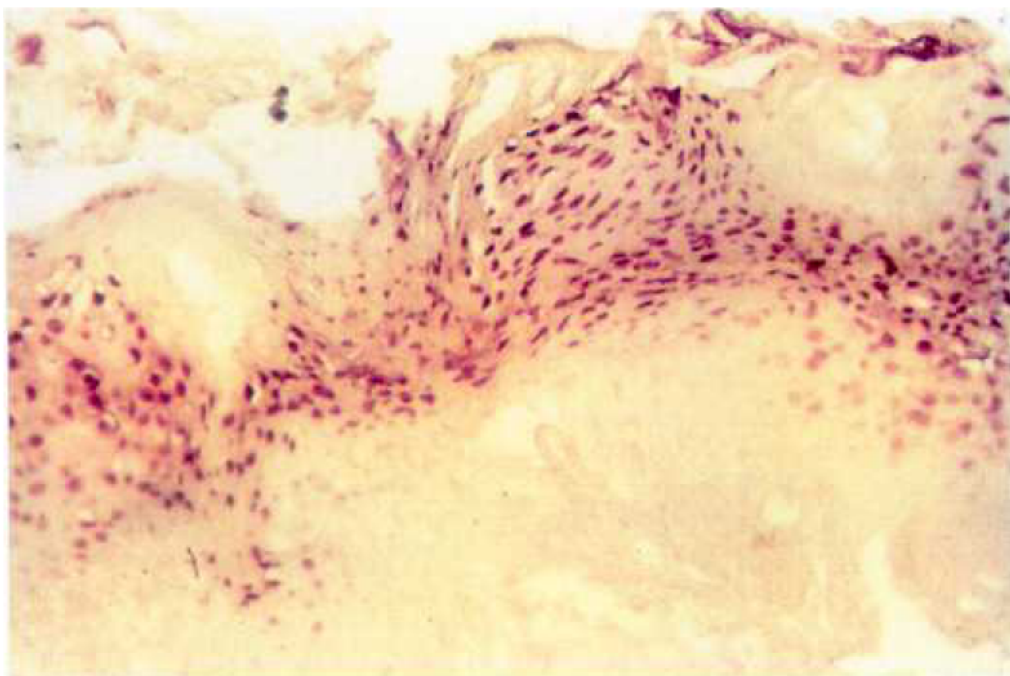


Figura IV.16. Biopsia de vulva positiva para los tipos 6/11 de HPV por HIS-tipado con un patrón de marcaje uniforme. (x 160)

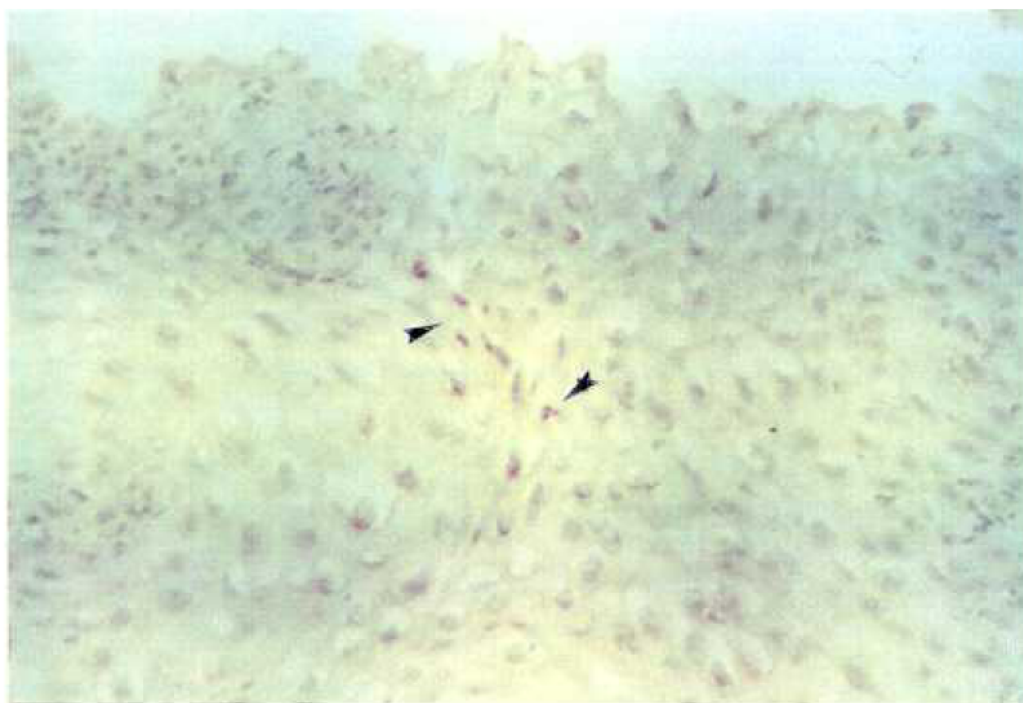


Figura IV.17. Patrón de marcaje puntual (flechas) obtenido por hibridación *in situ* en una biopsia de cérvix uterino positiva para los tipos 16/18 de HPV. (x 320).

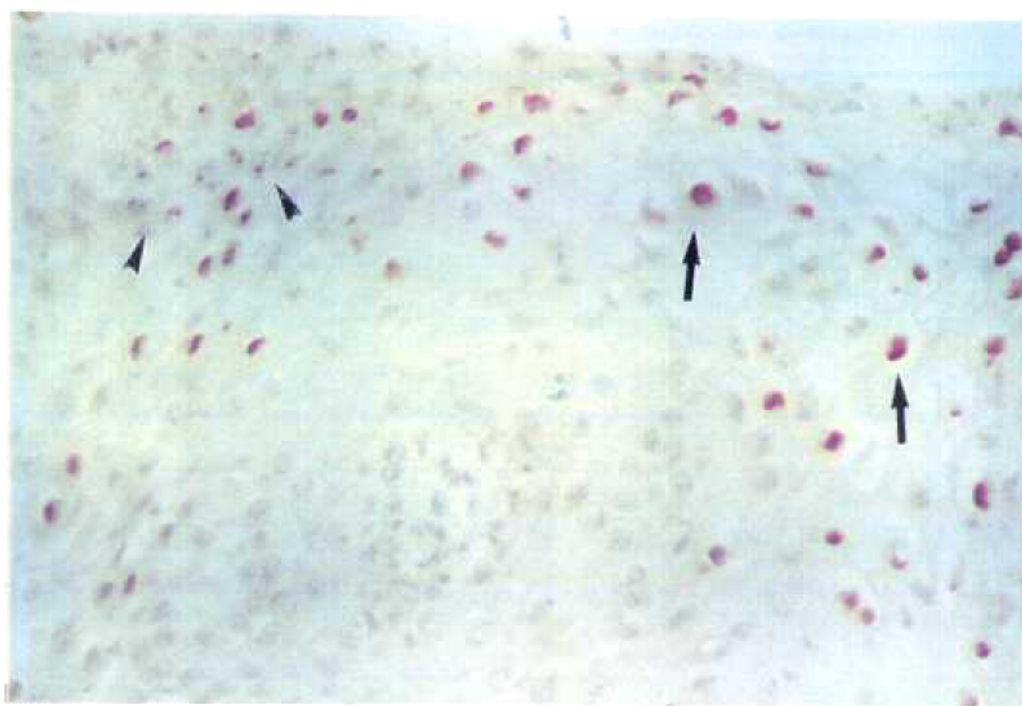


Figura IV.18. Patrón de marcaje mixto obtenido con hibridación *in situ* en una biopsia cervical positiva para los tipos 31/33/51 de HPV. Obsérvese la presencia simultánea de células con marcaje puntual (flecha corta) y uniforme (flecha larga). (x 320).

IV.5.1.1. Biopsias de vulva.

La distribución de los tres patrones de marcaje por lesiones y tipos virales detectados se detalla en las tablas IV.XV y IV.XVI, respectivamente.

En la figura IV.18 se ilustra la relación existente entre el patrón de marcaje y los tipos virales detectados en condilomas acuminados de vulva.

PATRON DE MARCAJE	LESION			
	Condiloma	VIN I	VIN II	Carcinoma
Uniforme	20	2	1	---
Puntual	1	---	2	3
Mixto	1	---	---	---

Tabla IV.XV. Clasificación de biopsias de vulva HPV-positivas según el patrón de marcaje observado y la lesión diagnosticada.

PATRON DE MARCAJE	TIPO VIRAL			
	6/11	16/18	31/33/51	Otros
Uniforme	21	1	---	1
Puntual	---	---	4	2
Mixto	1	---	---	---

Tabla IV.XVI. Clasificación de biopsias de vulva HPV-positivas según el patrón de marcaje observado y el tipo viral detectado.

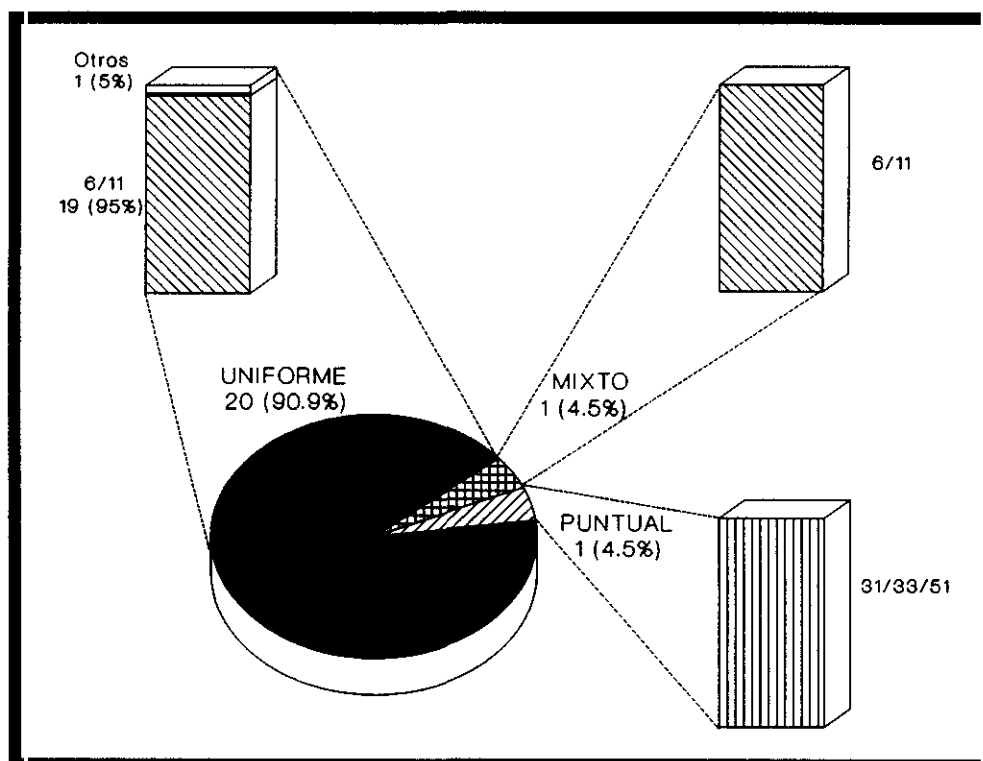


Figura IV.19. Distribución de patrones de marcaje en condilomas acuminados de vulva en relación con los tipos de HPV detectados.

IV.5.1.2. Biopsias de cérvix uterino.

La clasificación de las biopsias cervicales según el patrón de marcaje observado por hibridación *in situ*, en relación con la lesión diagnosticada y los tipos virales detectados se refleja en las figuras IV.20 y IV.21.

Estadísticamente la distribución de patrones de marcaje en los distintos tipos de lesión no difiere de forma significativa. Sí se demuestra, en cambio, diferencia significativa en la distribución de patrones de marcaje en relación con los tipos virales detectados, tanto cuando se consideran globalmente ($p < 10^{-6}$), como cuando se consideran por parejas ($p < 10^{-4}$ entre los tipos 6/11 y 16/18 de HPV, $p < 10^{-6}$ entre los tipos 6/11 y 31/33/51 de HPV y $p < 0.05$ entre los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV).

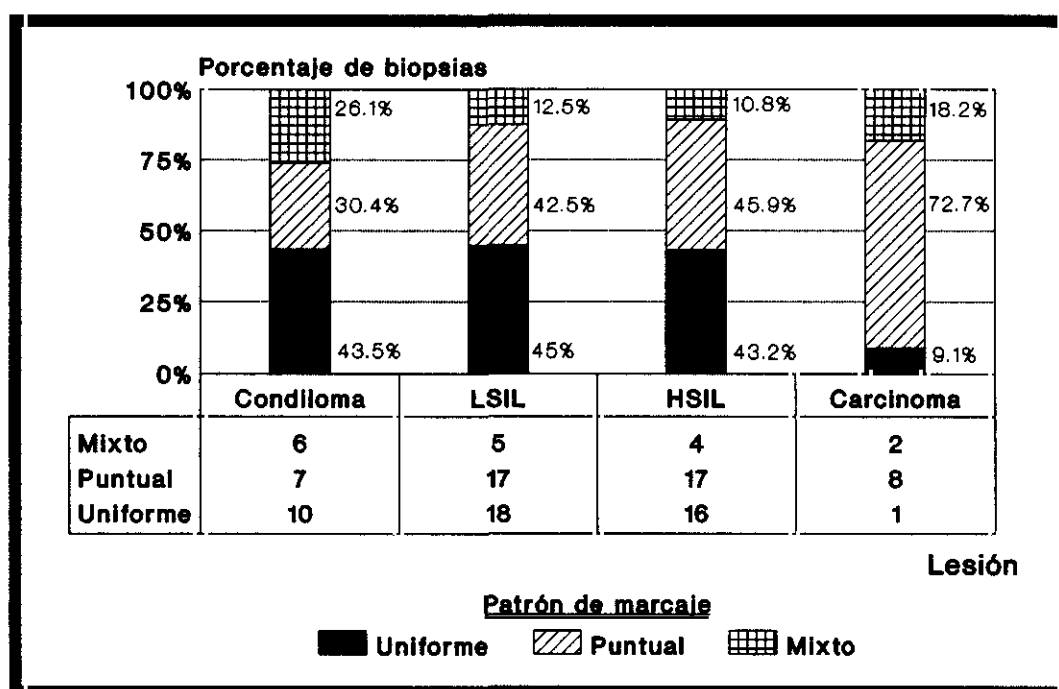


Figura IV.20. Clasificación de las biopsias cervicales en relación con la lesión diagnosticada y el patrón de marcaje observado por hibridación *in situ*.

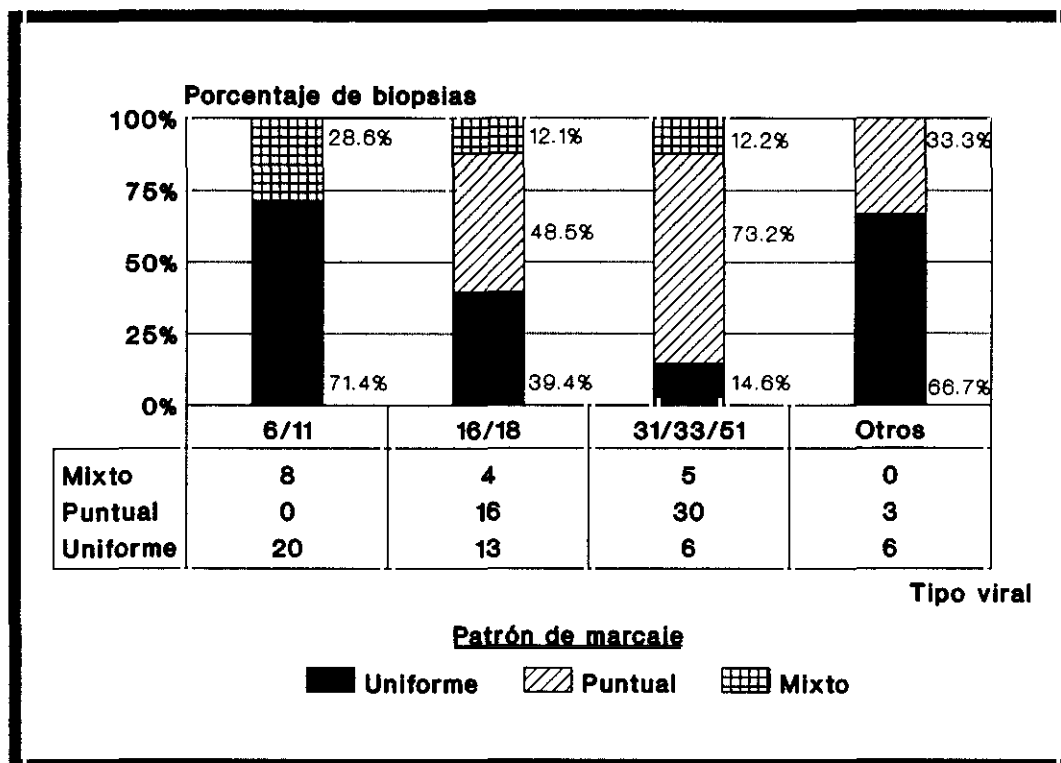


Figura IV.21. Clasificación de las biopsias cervicales según el tipo viral detectado y el patrón de marcaje observado por hibridación *in situ*.

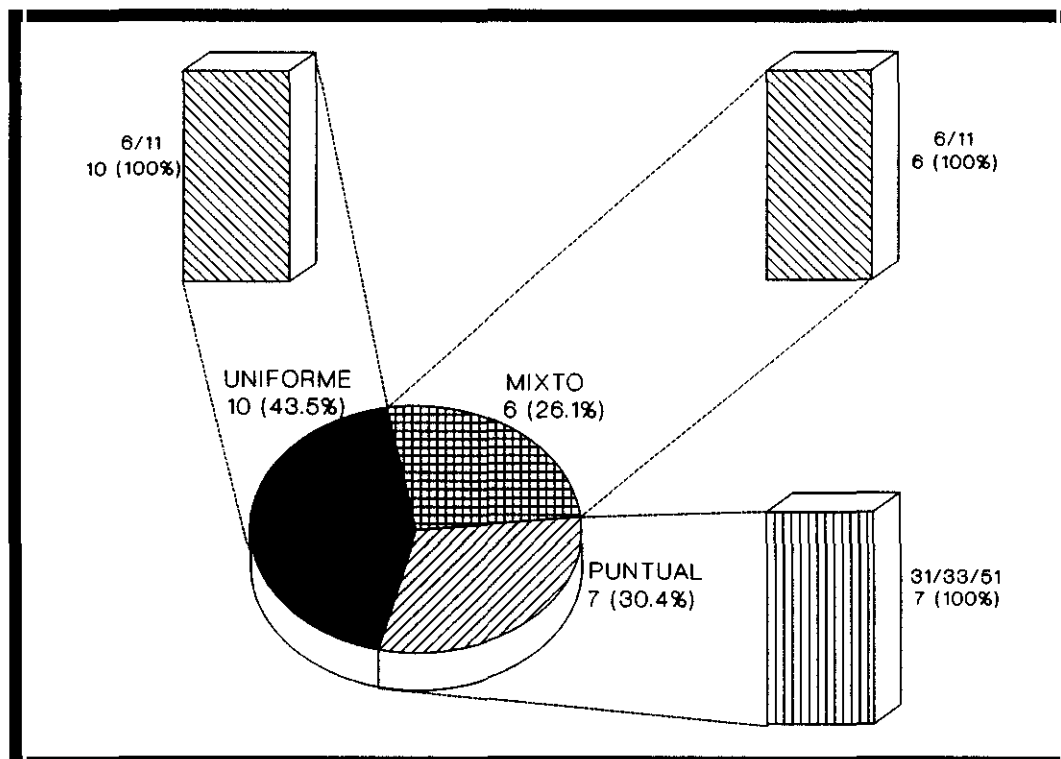


Figura IV.22. Distribución de patrones de marcaje en condilomas acuminados de cérvix en relación con los tipos de HPV detectados.

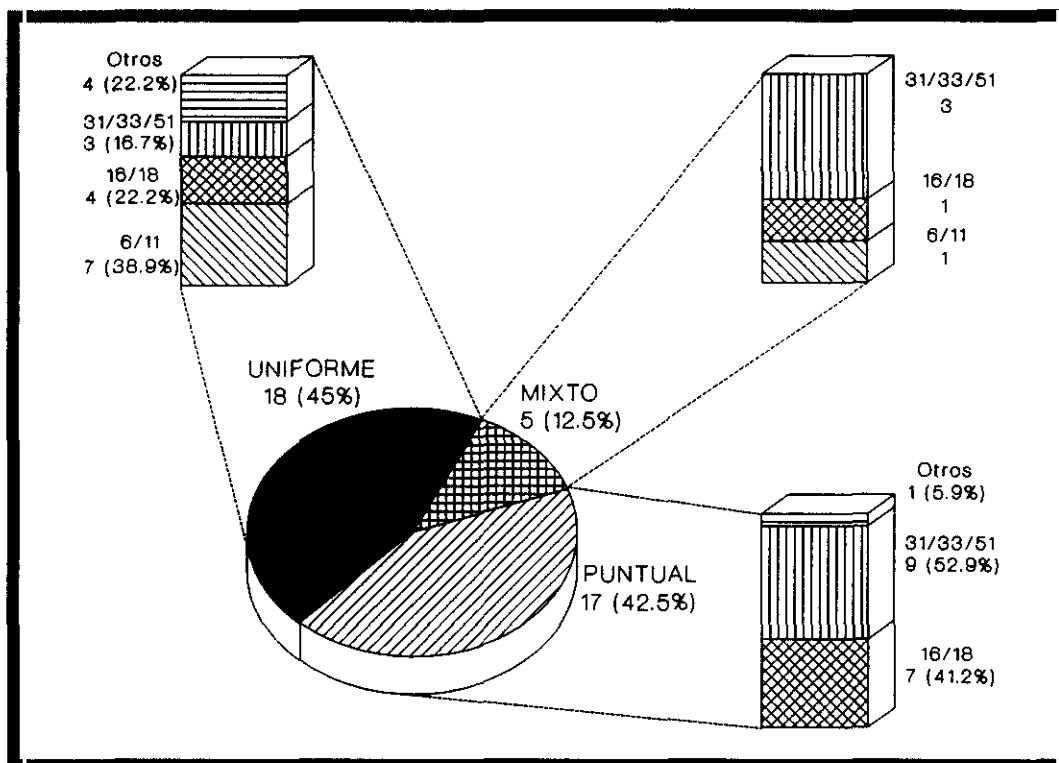


Figura IV.23. Distribución de patrones de marcaje en biopsias de cérvix diagnosticadas de LSIL en relación con los tipos de HPV detectados.

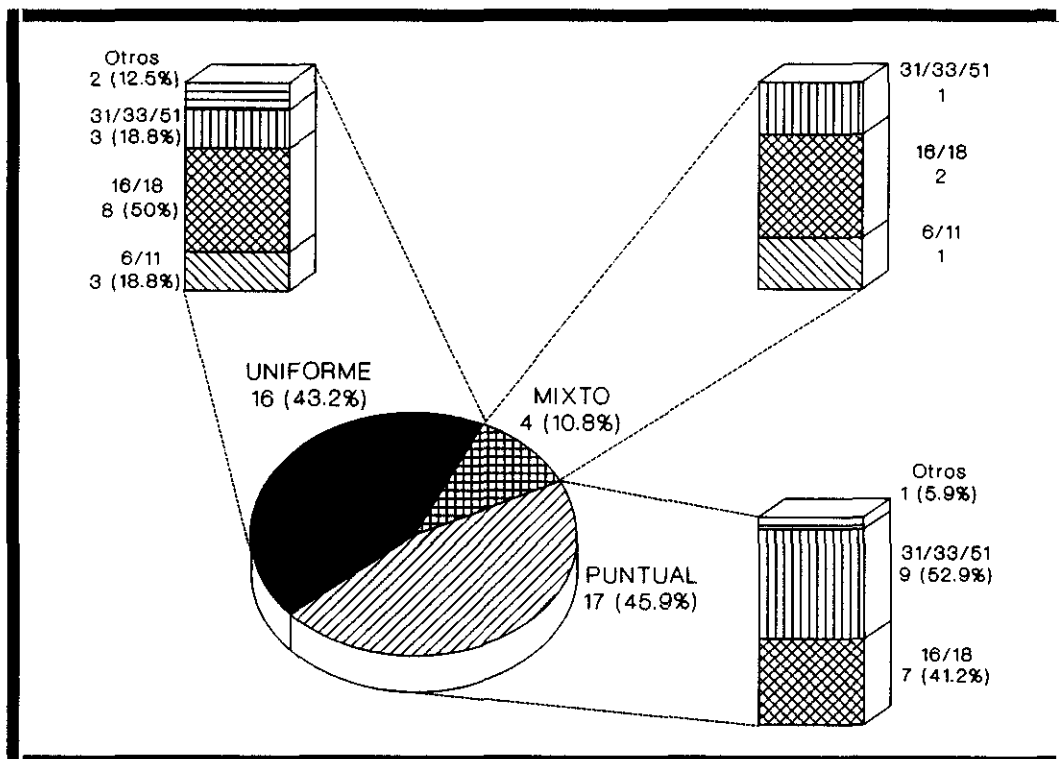


Figura IV.24. Distribución de patrones de marcaje en biopsias de cérvix diagnosticadas de HSIL en relación con los tipos de HPV detectados.

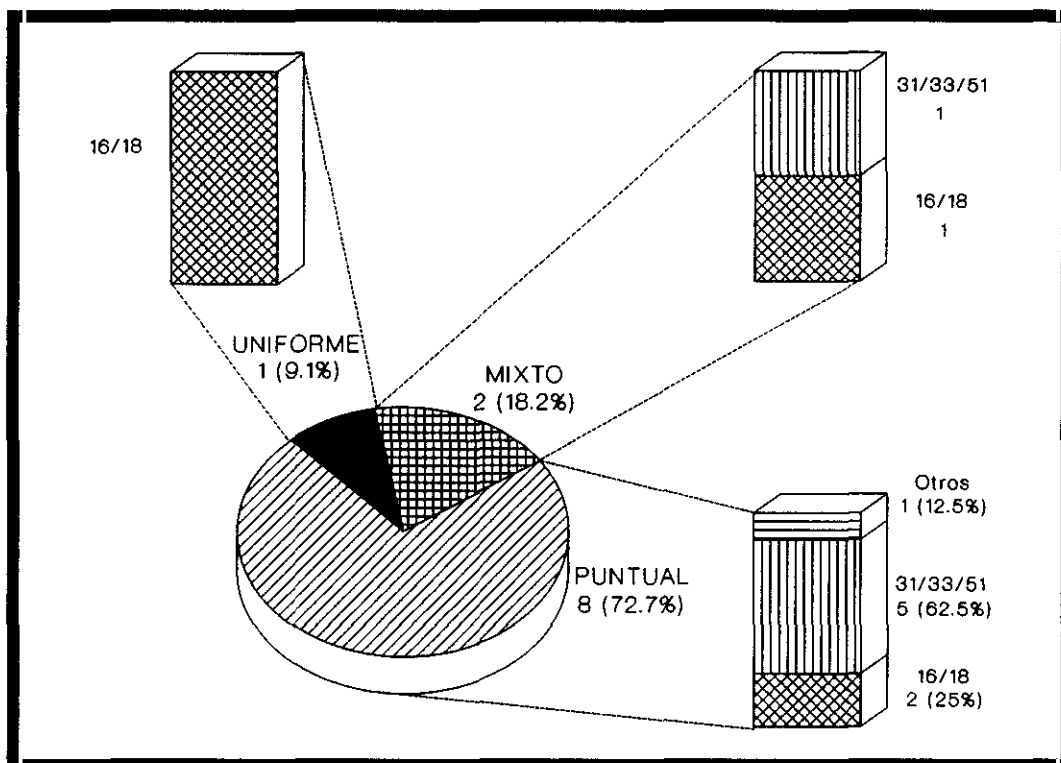


Figura IV.25. Distribución de patrones de marcaje en carcinomas de cérvix en relación con los tipos de HPV detectados.

La relación entre patrón de marcaje y tipos virales en cada lesión se ilustra en las figuras IV.22 (condilomas acuminados), IV.23 (LSIL), IV.24 (HSIL) y IV.25 (carcinomas).

Por último, en la tabla IV.XVII se detalla la relación entre el resultado obtenido con inmunohistoquímica y el patrón de marcaje.

PATRON DE MARCAJE	INMUNOHISTOQUIMICA	
	Positivo	Negativo
Uniforme	21	24
Puntual	2	47
Mixto	3	14

Tabla IV.XVII. Clasificación de biopsias cervicales según el resultado obtenido con inmunohistoquímica y el patrón de marcaje.

IV.5.1.3. Resultados globales.

Al considerar conjuntamente los resultados obtenidos en vulva y cérvix uterino, también se encuentra diferencia significativa en la distribución de patrones de marcaje por lesiones, tanto cuando se consideran estos resultados globalmente ($p < 0.003$), como cuando se consideran las lesiones por parejas ($p < 0.02$ entre condiloma y SIL y $p < 0.03$ entre SIL y carcinomas).

Para poder estudiar tablas de contingencia de 2x2, los resultados globales se agruparon como se muestra en las tablas IV.XVIII y IV.XIX.

PATRON DE MARCAJE	LESION		
	Condiloma	VIN/SIL	Carcinoma
Puntual	8	36	11
Uniforme + Mixto	37	46	3

Tabla IV.XVIII. Clasificación conjunta de biopsias de vulva y cérvix uterino HPV-positivas según el tipo puntual de patrón de marcaje y la lesión diagnosticada.

PATRON DE MARCAJE	LESION		
	Condiloma	VIN/SIL	Carcinoma
Puntual + Mixto	15	45	13
Uniforme	30	37	1

Tabla IV.XIX. Clasificación conjunta de biopsias de vulva y cérvix uterino HPV-positivas según el tipo uniforme de patrón de marcaje y la lesión diagnosticada.

Del análisis global de la tabla IV.XVIII se deduce una diferencia estadística significativa entre los patrones de marcaje observados en las distintas lesiones ($p < 10^{-4}$). Considerando las lesiones por parejas se obtienen los siguientes resultados:

1. VIN-SIL/Condiloma acuminado:

- Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.004$).
- Razón de ventaja de riesgo: 3.62
Intervalo de confianza al 95% (Cornfield): $1.40 < 3.62 < 9.64$

2. Carcinoma/VIN-SIL:

- Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.02$).
- Razón de ventaja de riesgo: 4.69
Límites exactos de confianza al 95%: $1.11 < 4.69 < 27.66$
- Riesgo relativo: 3.82
Intervalo de confianza al 95% (series de Taylor): $1.14 < 3.82 < 12.85$

El análisis global de la tabla IV.XIX señala igualmente una diferencia significativa entre los patrones de marcaje observados en los distintos tipos de lesión ($p < 0.0004$). Por parejas se obtienen los siguientes resultados:

1. VIN-SIL/Condiloma acuminado:

- Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.03$).
- Razón de ventaja de riesgo: 2.43
Intervalo de confianza al 95% (Cornfield): $1.07 < 2.43 < 5.68$

2. Carcinoma/VIN-SIL:

- Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.008$).
- Razón de ventaja de riesgo: 10.69
Límites exactos de confianza al 95%: $1.45 < 10.69 < 466.27$
- Riesgo relativo: 8.52
Intervalo de confianza al 95% (series de Taylor): $1.16 < 8.52 < 62.46$

IV.5.2. PATRON DE DISTRIBUCION DE LAS CELULAS POSITIVAS.

Se han considerado dos patrones de distribución de células positivas a lo largo del epitelio:

1. **Multifocal:** se observan grupos de células positivas alternando con zonas de epitelio en las que no aparecen células marcadas (fig. IV.26).
2. **Aislado:** se observan pocas células positivas y aisladas unas de otras (fig. IV.27).

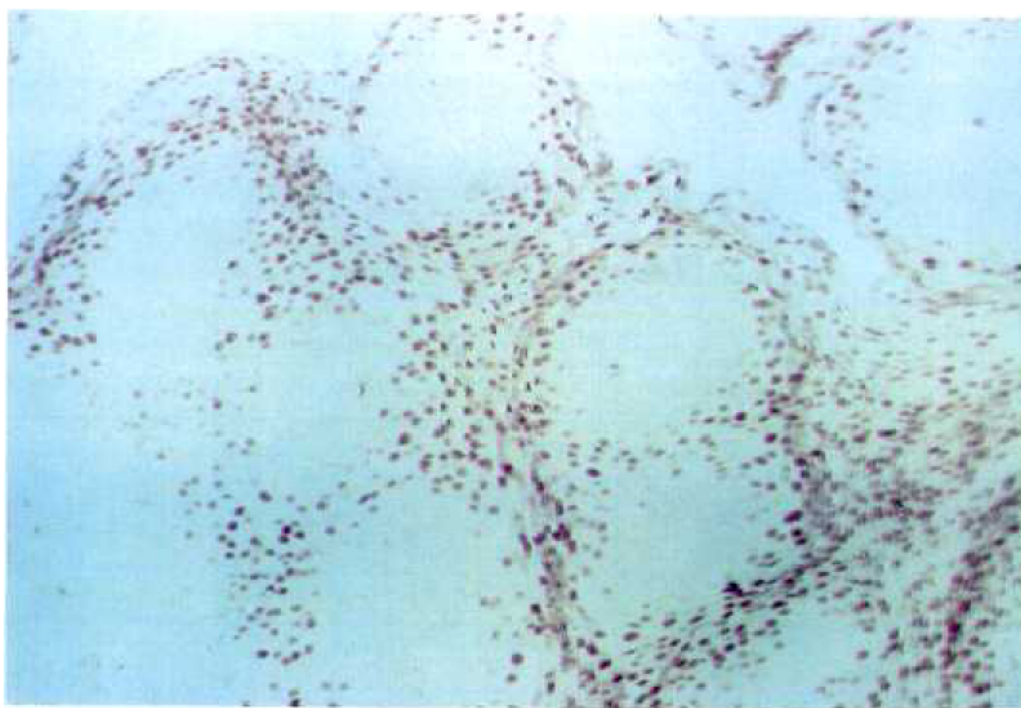


Figura IV.26. Patrón de distribución multifocal de células positivas por hibridación *in situ* en un condiloma de vulva positivo para los tipos 6/11 de HPV. (x 100).

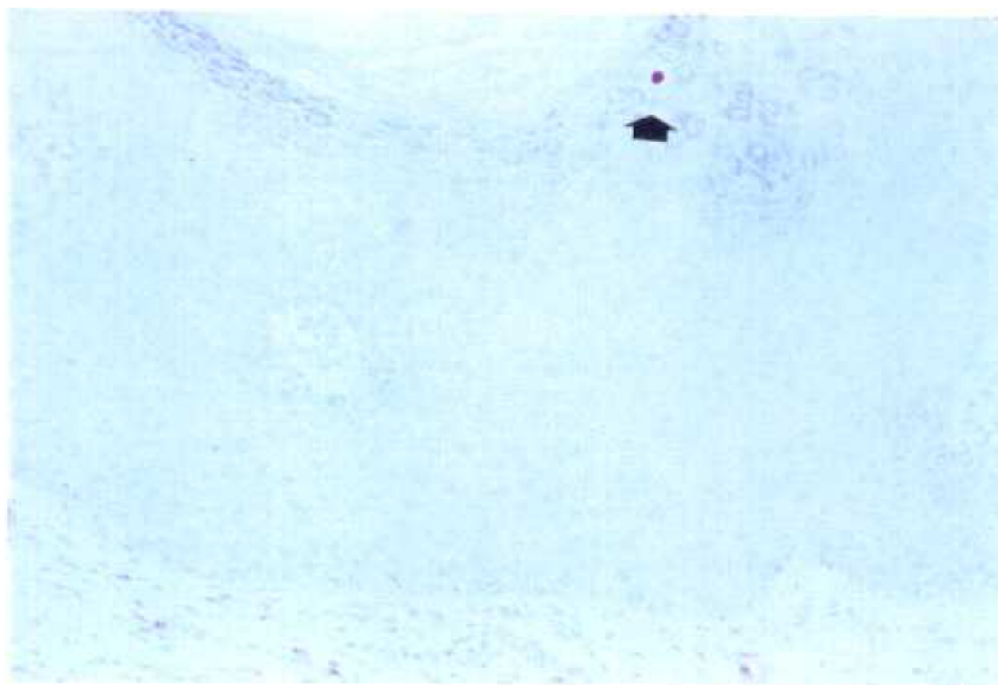


Figura IV.27. Condiloma acuminado de vulva positivo para los tipos 6/11 de HPV por hibridación *in situ* con patrón de distribución aislado. Se observa sólo una célula claramente positiva (flecha). (x 160).

IV.5.2.1. Biopsias de vulva.

En las tablas IV.XX y IV.XXI se muestra la clasificación de las piezas de vulva según este parámetro histológico, en relación con las lesiones diagnosticadas y los tipos de HPV detectados. En la figura IV.28 se ilustra la relación existente entre el patrón de distribución y los tipos virales detectados en condilomas acuminados de vulva.

PATRON DE DISTRIBUCION	LESION			
	Condiloma	VIN I	VIN II	Carcinoma
Multifocal	14	2	1	---
Aislado	8	---	2	3

Tabla IV.XX. Clasificación de biopsias de vulva HPV-positivas según el patrón de distribución observado y la lesión diagnosticada.

PATRON DE DISTRIBUCION	TIPO VIRAL			
	6/11	16/18	31/33/51	Otros
Multifocal	15	---	1	1
Aislado	7	1	3	2

Tabla IV.XXI. Clasificación de biopsias de vulva HPV-positivas según el patrón de distribución observado y el tipo viral detectado.

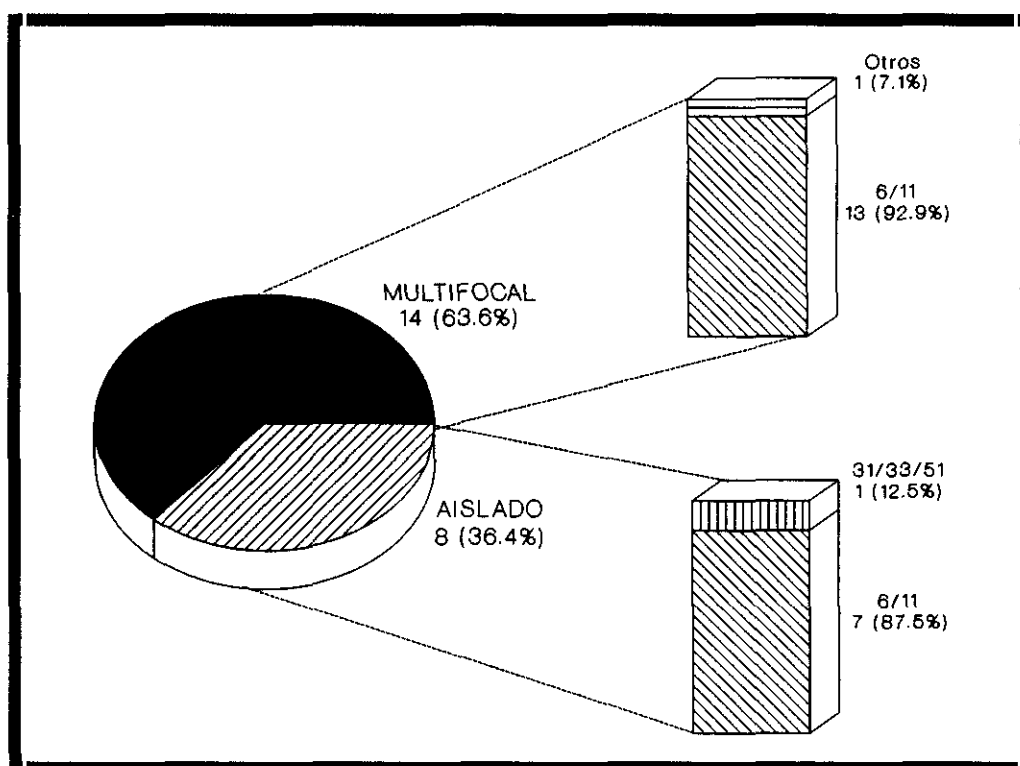


Figura IV.28. Relación entre el patrón de distribución de células positivas y el tipo de HPV detectado en condilomas acuminados de vulva.

IV.5.2.2. Biopsias de cérvix uterino.

La clasificación de las biopsias cervicales según las lesiones diagnosticadas y los tipos virales detectados, en relación con los dos patrones de distribución de células positivas por hibridación *in situ*, se representa gráficamente en las figuras IV.29 y IV.30.

La prueba de χ^2 aplicada globalmente a los datos de la figura IV.29 indica que no hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos en cada tipo de lesión; sin embargo, cuando este test estadístico se aplica a los resultados obtenidos en condilomas acuminados y SIL, las diferencias halladas entre los porcentajes para cada patrón de distribución sí son significativas ($p < 0.02$; razón de ventaja de riesgo: 3.25). También son significativas estas diferencias cuando se consideran conjuntamente los resultados obtenidos en vulva y cérvix uterino, tanto globalmente ($p < 0.005$), como entre condilomas y SIL ($p < 0.003$; razón de ventaja de riesgo: 3.42); sin embargo, no hay diferencia significativa entre SIL y carcinomas.

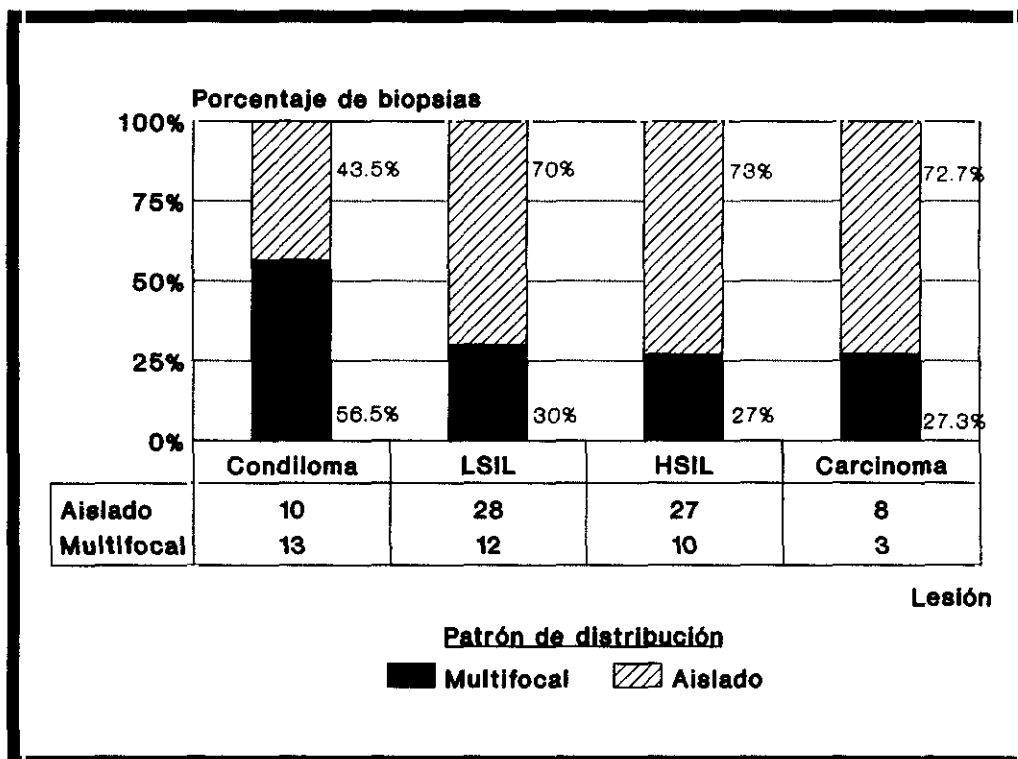


Figura IV.29. Clasificación de biopsias cervicales según la lesión diagnosticada y el patrón de distribución de células positivas por hibridación *in situ*.

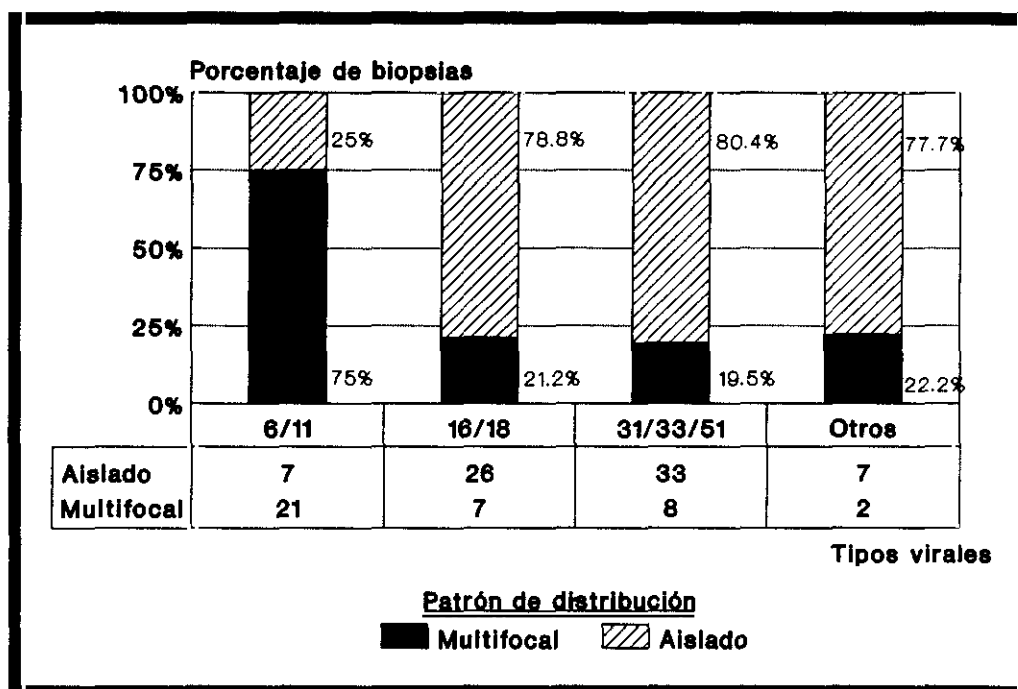


Figura IV.30. Clasificación de biopsias de cérvix según los tipos virales detectados y el patrón de distribución de células positivas por HIS.

Por lo que respecta a los datos representados en la figura IV.30, hay una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos cuando se consideran globalmente ($p < 4 \times 10^{-6}$); esta diferencia es también significativa cuando se consideran sólo las biopsias positivas para los tipos de HPV 6/11 y 16/18 ($p < 9 \times 10^{-5}$) ó 6/11 y 31/33/51 ($p < 2 \times 10^{-5}$). No hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos en biopsias positivas para los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV.

La relación entre ambos patrones de distribución de células positivas y los tipos virales detectados en cada lesión se detallan en las figuras IV.31 (condilomas acuminados), IV.32 (LSIL), IV.33 (HSIL) y IV.34 (carcinomas).

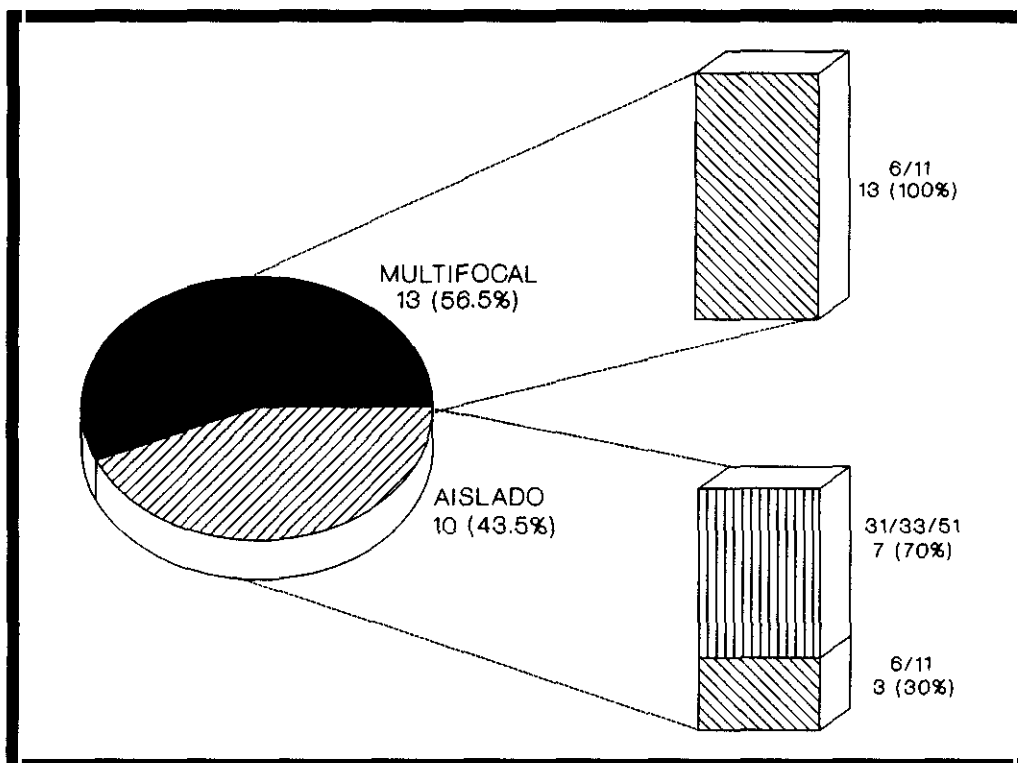


Figura IV.31. Relación entre el patrón de distribución de células positivas y el tipo de HPV detectado por HIS en condilomas acuminados de cérvix.

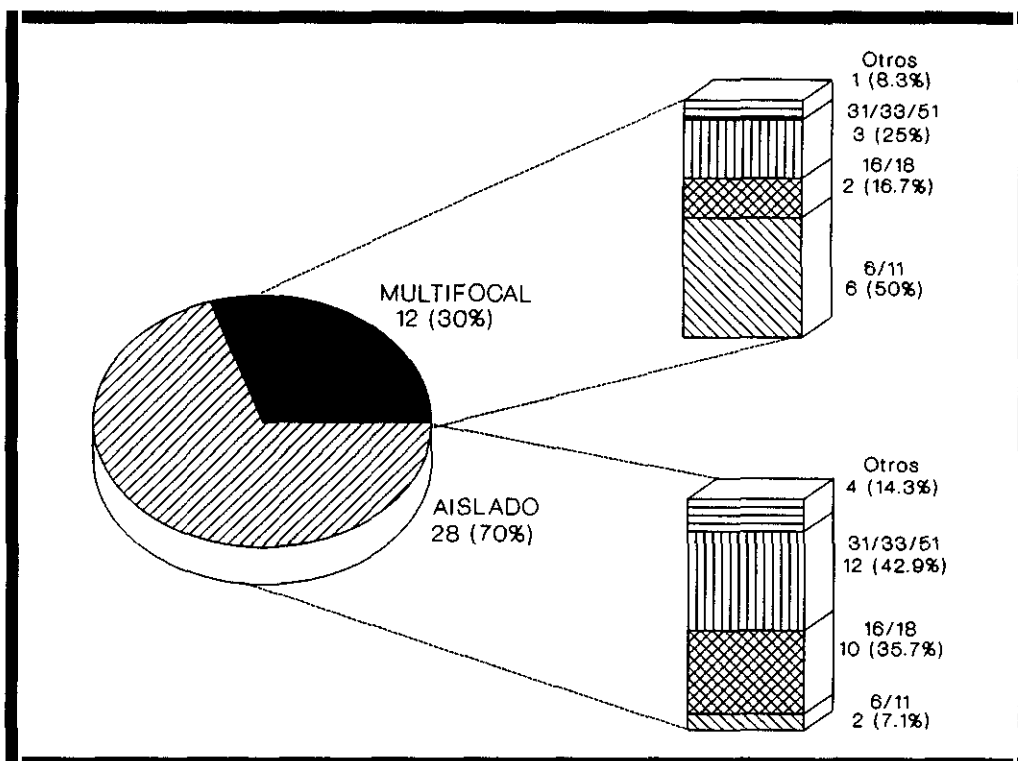


Figura IV.32. Relación entre el patrón de distribución de células positivas y el tipo de HPV detectado por HIS en lesiones de cérvix diagnosticadas de LSIL.

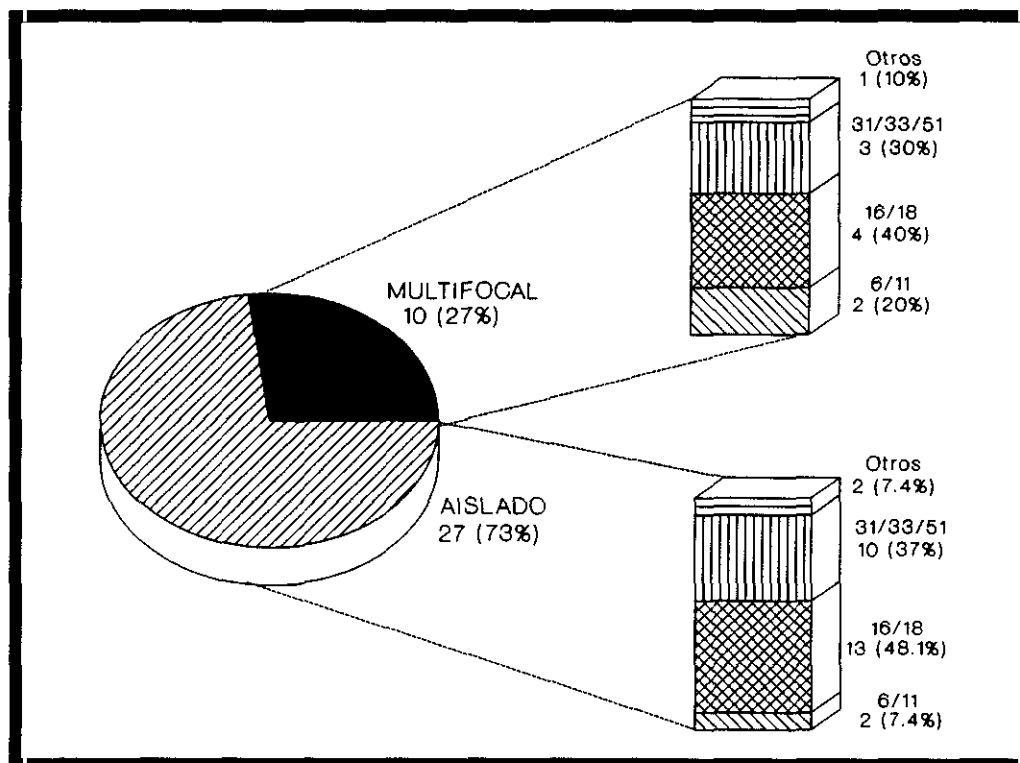


Figura IV.33. Relación entre el patrón de distribución de células positivas y el tipo de HPV detectado por HIS en biopsias de cérvix diagnosticadas de HSIL.

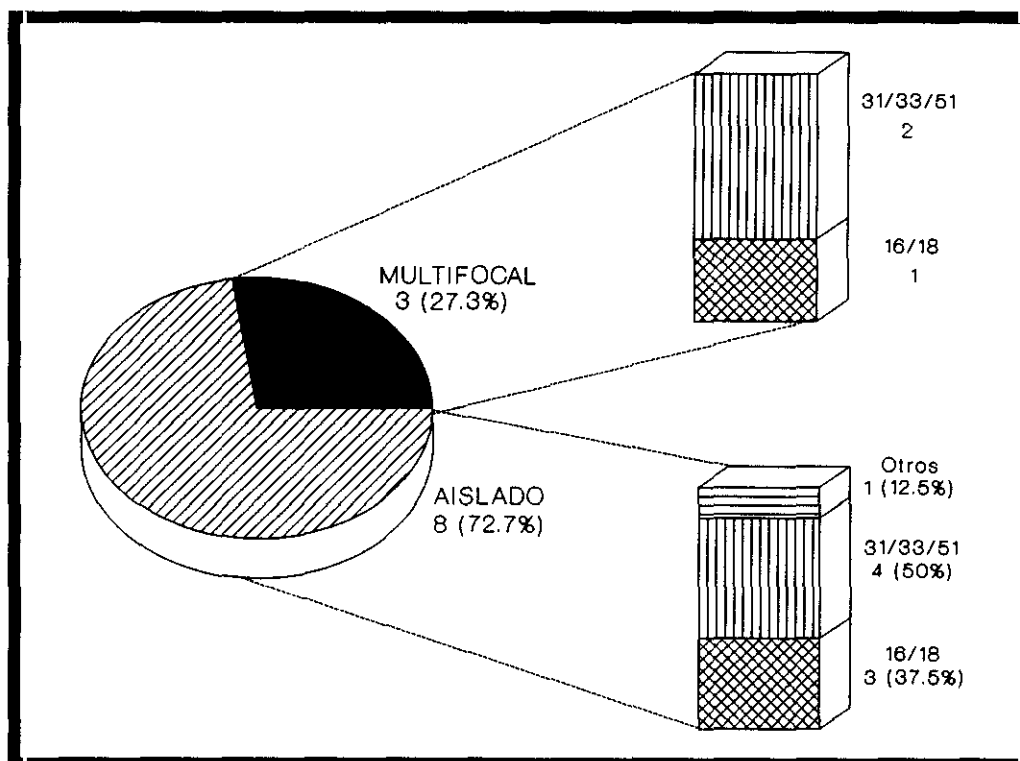


Figura IV.34. Relación entre el patrón de distribución de células positivas y el tipo de HPV detectado por HIS en carcinomas de cérvix.

Para finalizar, en la tabla IV.XXII se muestra la relación entre los resultados inmunohistoquímicos y el patrón de distribución.

PATRON DE DISTRIBUCION	INMUNOHISTOQUIMICA	
	Positivo	Negativo
Multifocal	21	17
Aislado	5	68

Tabla IV.XXII. Clasificación de biopsias cervicales según los resultados inmunohistoquímicos y el patrón de distribución.

IV.5.3. POSICION RELATIVA DE LAS CELULAS POSITIVAS EN EL GROSOR DEL EPITELIO.

Las biopsias HPV-positivas por hibridación *in situ* se dividieron en tres grupos dependiendo de la altura del epitelio en la que aparecen células marcadas:

1. Superior: sólo aparecen células positivas en el tercio superior del epitelio (fig. IV.35).
2. Medio: se observan células positivas en los tercios superior y medio del epitelio (fig. IV.36).
3. Inferior: se observan células positivas en los tres tercios del epitelio, incluyendo en ocasiones las capas de células basales y parabasales (fig. IV.37).

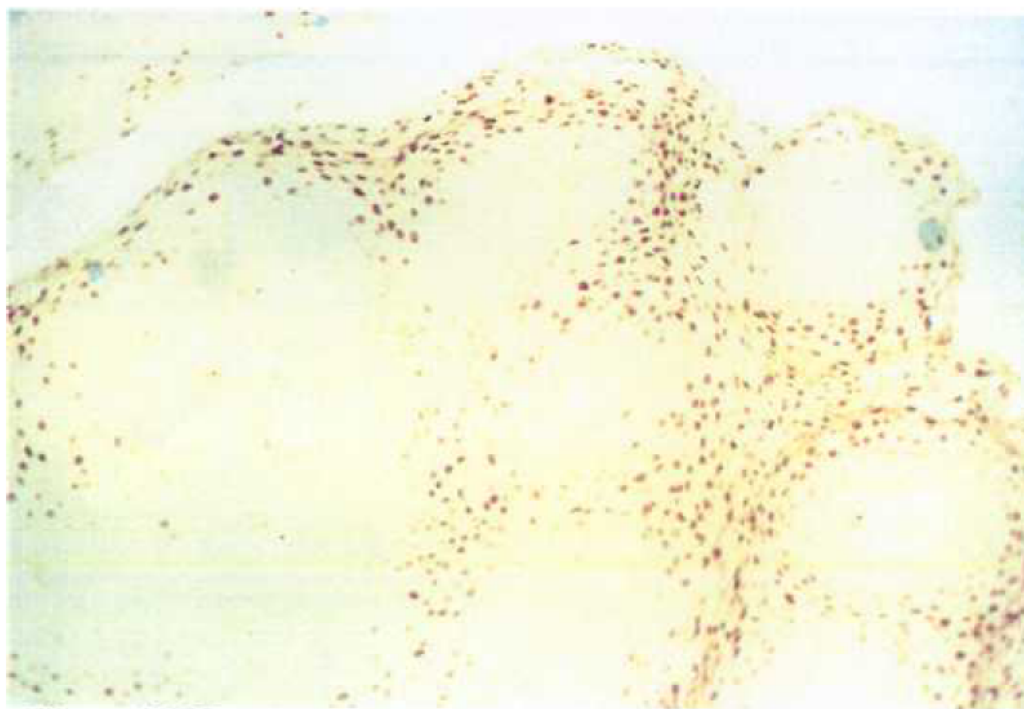


Figura IV.35. Corte transversal de un condiloma acuminado de vulva positivo para los tipos 6/11 de HPV. La reacción positiva se aprecia en células del tercio superior del epitelio. (x 100).

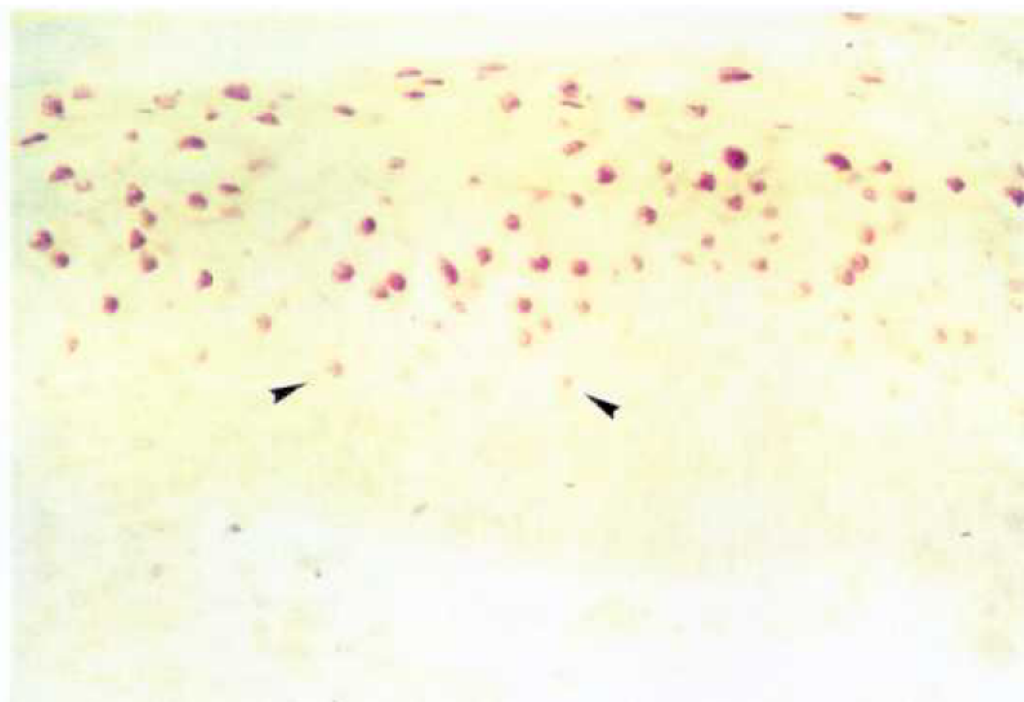


Figura IV.36. Biopsia cervical positiva para los tipos 6/11 de HPV por hibridación *in situ*. Se observan células marcadas en el tercio medio del epitelio (flecha). (x 320)

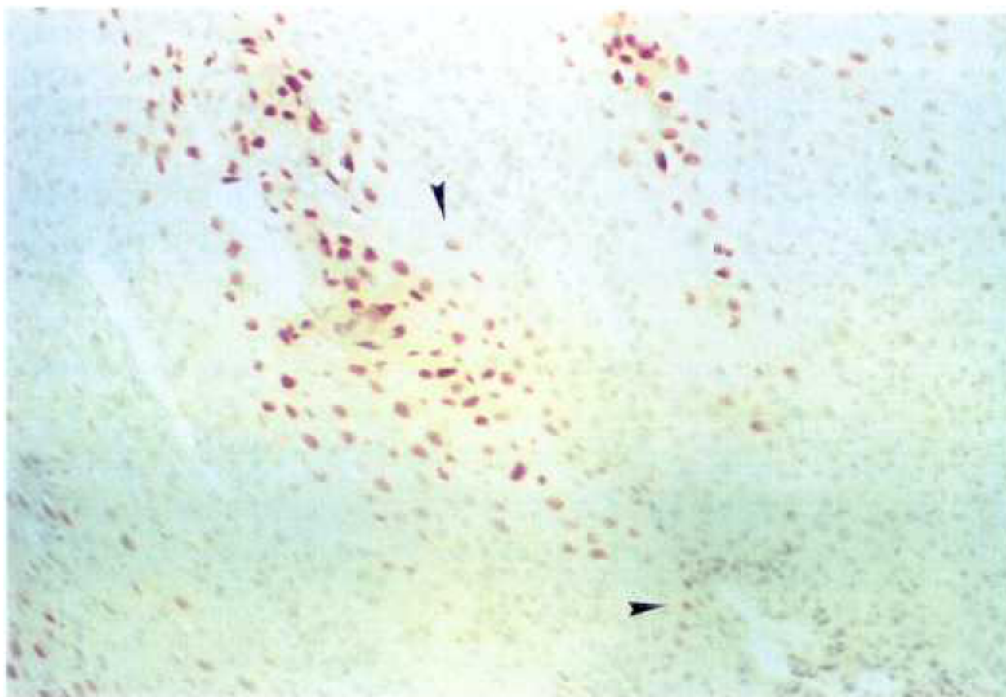


Figura IV.37. Reacción positiva para los tipos 6/11 de HPV por hibridación *in situ*. Obsérvese la presencia de células marcadas en el tercio inferior del epitelio (flechas). (x 200).

A diferencia de los patrones de marcaje y distribución de células positivas, en este caso no se han considerado las biopsias diagnosticadas de carcinoma, ya que al perderse la arquitectura del tejido no es posible distinguir la posición relativa de las células marcadas en el grosor del epitelio. En consecuencia el número total de biopsias consideradas ha sido de 127: 100 de cérvix y 27 de vulva.

IV.5.3.1. Biopsias de vulva.

La clasificación de las biopsias de vulva según esta característica en relación con las lesiones diagnosticadas y los tipos virales detectados se especifica en las tablas IV.XXIII y IV.XXIV, respectivamente.

TERCIO DE EPITELIO	LESION		
	Condiloma	VIN I	VIN II
Superior	3	---	1
Medio	17	2	2
Inferior	2	---	---

Tabla IV.XXIII. Clasificación de las biopsias de vulva según la posición relativa en el grosor del epitelio de las células positivas por hibridación *in situ*.

TERCIO DE EPITELIO	TIPO VIRAL			
	6/11	16/18	31/33/51	Otros
Superior	2	---	1	1
Medio	18	1	2	---
Inferior	2	---	---	---

Tabla IV.XXIV. Relación entre el tipo viral y la posición relativa en el grosor del epitelio de las células positivas por hibridación *in situ* en biopsias de vulva.

IV.5.3.2. Biopsias de cérvix uterino.

La clasificación de las biopsias cervicales por lesiones y por tipos virales, en relación con la posición relativa ocupada por las células positivas por hibridación *in situ* en el grosor del epitelio se especifica en las figuras IV.38 y IV.39.

El análisis estadístico de las correspondientes tablas de contingencia demuestra la independencia entre las variables estudiadas. Es decir, no existe una asociación significativa entre la posición relativa en el grosor del epitelio de las células positivas por hibridación *in situ* y el tipo de lesión o el tipo de HPV detectado.

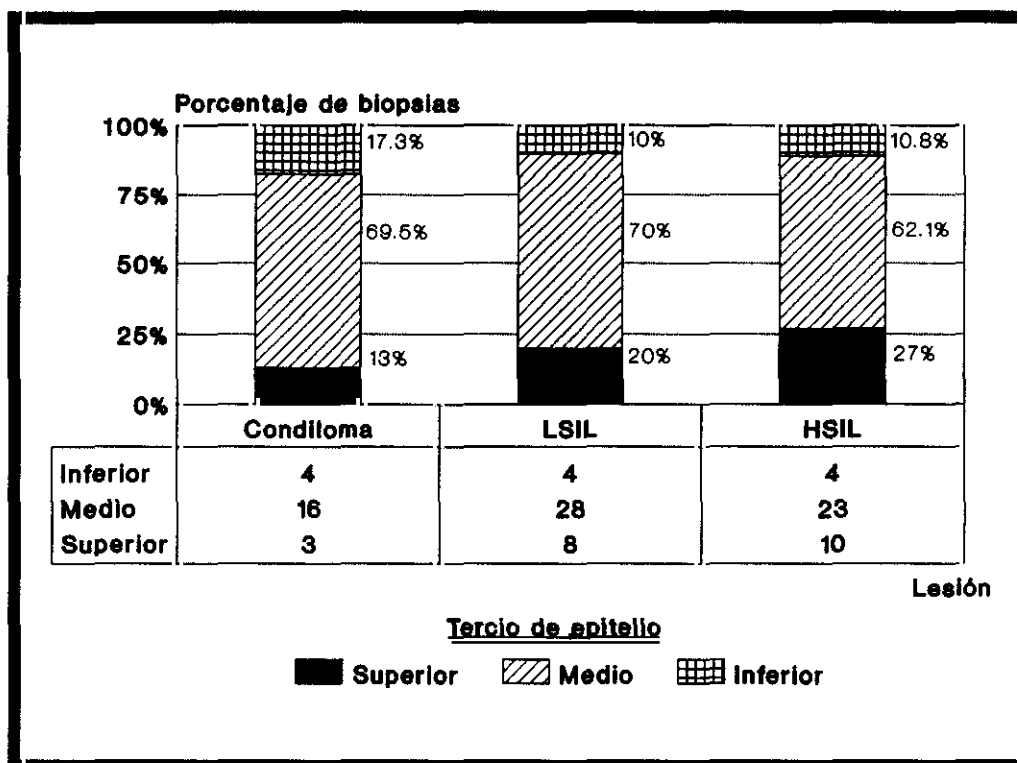


Figura IV.38. Clasificación de biopsias cervicales según la posición relativa de las células positivas por hibridación *in situ* en el grosor del epitelio.

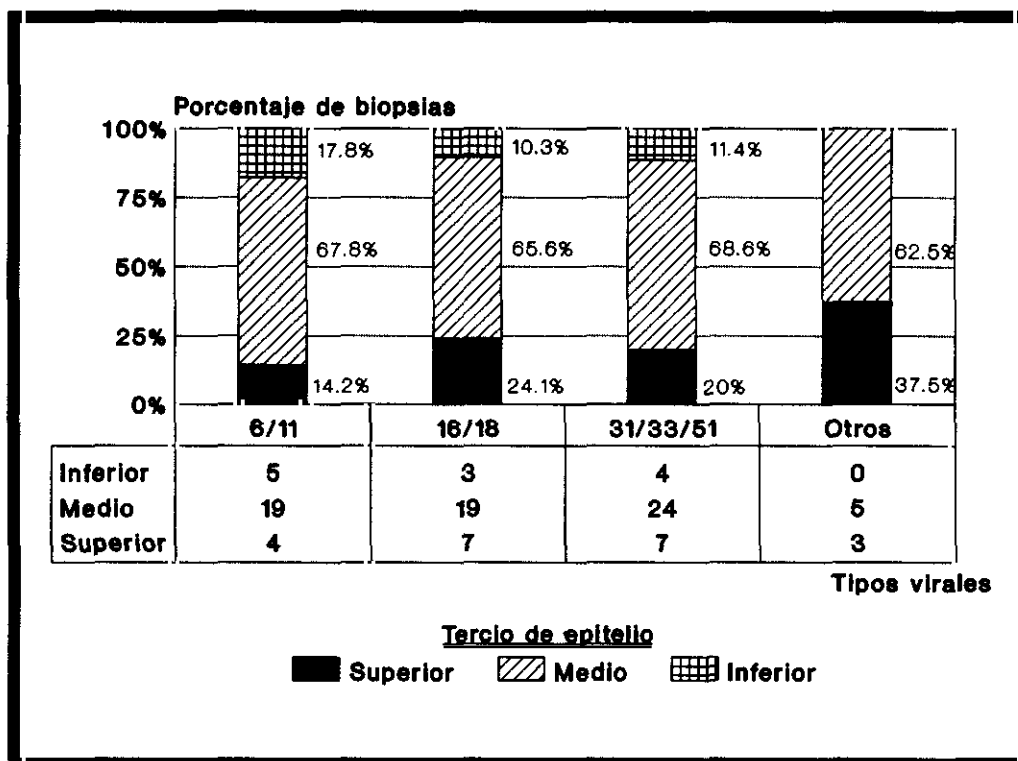


Figura IV.39. Relación entre el tipo viral y la posición relativa de las células positivas por hibridación *in situ* en el grosor del epitelio en biopsias cervicales.

IV.5.4. RELACION ENTRE EL PATRON DE MARCAJE Y EL PATRON DE DISTRIBUCION.

En las tablas IV.XXV y IV.XXVI se detalla la clasificación de biopsias de cérvix HPV-positivas por hibridación *in situ*, en relación con el patrón de marcaje, el patrón de distribución de células positivas y el tipo de lesión diagnosticado o el tipo de HPV detectado, respectivamente. El análisis estadístico global de ambas tablas indica que hay una diferencia significativa en los resultados obtenidos por cada tipo de lesión ($p < 0.04$) y por cada grupo de virus ($p < 10^{-6}$). Sin embargo, cuando el análisis se realiza comparando las lesiones y los grupos virales por parejas no se observa una diferencia significativa entre LSIL y HSIL ni entre los tipos virales 16/18 y 31/33/51.

PATRON DE MARCAJE	PATRON DE DISTRIBUCION	LESION			
		CONDILOMA	LSIL	HSIL	CARCINOMA
UNIFORME	MULTIFOCAL	9	10	6	---
	AISLADO	1	8	10	1
PUNTUAL	MUTIFOCAL	---	2	3	1
	AISLADO	7	15	14	7
MIXTO	MULTIFOCAL	4	---	1	2
	AISLADO	2	5	3	---

Tabla IV.XXV. Clasificación de biopsias de cérvix HPV-positivas por hibridación *in situ* según la lesión diagnosticada y los patrones de marcaje y distribución.

PATRON DE MARCAJE	PATRON DE DISTRIBUCION	TIPO VIRAL			
		6/11	16/18	31/33/51	Otros
UNIFORME	MULTIFOCAL	16	4	3	2
	AISLADO	4	9	3	4
PUNTUAL	MULTIFOCAL	---	2	4	---
	AISLADO	---	14	26	3
MIXTO	MULTIFOCAL	5	1	1	---
	AISLADO	3	3	4	---

Tabla IV.XXVI. Clasificación de biopsias de cérvix HPV-positivas por hibridación *in situ* según el tipo viral detectado y los patrones de marcaje y distribución.

PATRONES DE MARCAJE Y DISTRIBUCION	LESION		
	CONDILOMA	VIN/SIL	CARCINOMA
PUNTUAL/AISLADO	8	31	10
RESTO	37	51	4

Tabla IV.XXVII. Distribución de biopsias de vulva y cérvix positivas por hibridación *in situ* según la lesión diagnosticada y los patrones de marcaje y distribución.

Para poder estudiar tablas de contingencia de 2x2, se consideraron globalmente los resultados de vulva y cérvix y se agruparon como se muestra en la tabla IV.XXVII. El análisis global de esta tabla arroja una diferencia estadísticamente significativa ($p < 8 \times 10^{-4}$). Al considerar las lesiones por parejas se obtuvieron los siguientes resultados:

1. VIN-SIL/Condiloma:

- Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.02$).
- Razón de ventaja de riesgo: 2.81
- Intervalo de confianza al 95% (Cornfield): $1.08 < 2.81 < 7.5$

2. Carcinoma/VIN-SIL:

- Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.02$).
- Razón de ventaja de riesgo: 4.11
Límites exactos de confianza al 95%: $1.06 < 4.11 < 19.25$
- Riesgo relativo: 3.35
Intervalo de confianza al 95% (series de Taylor): $1.13 < 3.35 < 9.94$

IV.6. ESTUDIOS COMPARATIVOS.

Para la realización de estudios comparativos se han tenido en cuenta sólo los resultados obtenidos en biopsias con una longitud de epitelio superior a 5 mm, para minimizar en lo posible el sesgo en los cálculos estadísticos debido a falsos negativos por tamaño inadecuado de la pieza. Se han incluido también los casos diagnosticados de carcinoma, pues todos ellos tenían un tamaño suficientemente representativo. Por lo tanto, el número total de biopsias incluidas en estos estudios ha sido de 168: 130 de cérvix y 38 de vulva.

IV.6.1. COMPARACION ENTRE INMUNOHISTOQUIMICA E HIBRIDACION *IN SITU*.

De las 168 biopsias consideradas, 138 fueron positivas para HPV con la técnica de HIS-detección (82.1%), mientras que sólo 49 dieron un resultado positivo con la técnica de inmunohistoquímica (29.2%). Ninguna biopsia fue positiva por inmunohistoquímica y negativa por hibridación *in situ*.

La distribución de casos positivos por cada técnica en piezas de vulva y

cérvix por separado, agrupados según las lesiones diagnosticadas, se detalla en las tablas IV.XXVIII y IV.XXIX. En ellas se incluye, además, la sensibilidad de la inmunohistoquímica frente a la hibridación *in situ* en cada tipo de lesión. En ambos casos las diferencias entre los resultados obtenidos con ambas técnicas son estadísticamente significativas ($p < 0.006$ en piezas de vulva y $p < 10^{-6}$ en piezas de cérvix uterino).

TECNICA	LESION				
	Condiloma (n=29)	VIN I (n=3)	VIN II (n=3)	Carcinoma (n=3)	Total (n=38)
IHQ + ¹	18	1	1	1	21
HIS + ²	25	2	3	3	33
IHQ/HIS ³	72%	---	---	---	63.6%

¹ Número de biopsias positivas por inmunohistoquímica.

² Número de biopsias positivas por hibridación *in situ*.

³ Sensibilidad de la inmunohistoquímica respecto de la hibridación *in situ*.

Tabla IV.XXVIII. Resultados de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en biopsias de vulva, con expresión de la sensibilidad de una técnica con respecto de otra.

TECNICA	LESION				Total (n=130)
	Condiloma (n=23)	LSIL (n=57)	HSIL (n=38)	Carcinoma (n=12)	
IHQ + ¹	14	10	4	---	28
HIS + ²	22	39	33	11	105
IHQ/HIS ³	63.6%	25.6%	12.1%	---	26.7%

¹ Número de biopsias positivas por inmunohistoquímica.

² Número de biopsias positivas por hibridación *in situ*.

³ Sensibilidad de la inmunohistoquímica respecto de la hibridación *in situ*.

Tabla IV.XXIX. Resultados de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en biopsias de cérvix, con expresión de la sensibilidad de una técnica respecto de la otra.

Si consideramos cada técnica por separado, el análisis de la tabla IV.XXIX muestra una diferencia significativa entre los resultados obtenidos en cada lesión, tanto con inmunohistoquímica ($p < 5 \times 10^{-6}$), como con HIS-detección ($p < 0.02$). Sin embargo, en el caso de la hibridación *in situ*, las diferencias no son significativas si no se consideran las LSIL o si se consideran conjuntamente LSIL y HSIL.

También hay diferencia significativa entre las sensibilidades de la inmunohistoquímica con respecto a la hibridación *in situ* en las distintas lesiones cervicales ($p < 5 \times 10^{-5}$), cuando éstas se consideran globalmente. El análisis estadístico por parejas de lesiones arroja los siguientes resultados:

1. Condiloma/SIL:

- Diferencia estadísticamente significativa ($p < 8 \times 10^{-5}$).
- Razón de ventaja de riesgo: 7.25
Intervalo de confianza al 95% (Cornfield): $2.28 < 7.25 < 23.79$

2. SIL/Carcinoma:

- Diferencia estadísticamente no significativa.

En las figuras IV.40 y IV.41 se ilustran de forma comparativa los resultados porcentuales de positividad obtenidos con ambas técnicas en las distintas lesiones, según la procedencia anatómica de las biopsias.

Por lo que respecta a la sensibilidad de la inmunohistoquímica frente a la hibridación *in situ* en relación con los tipos virales detectados con esta última técnica, de las 56 biopsias positivas para los tipos 6/11 de HPV, 41 (73.2%) fueron positivas por inmunohistoquímica; de las 34 muestras positivas para los tipos 16/18 de HPV, 8 (23.5%) fueron positivas por inmunohistoquímica; finalmente, de las 52 piezas positivas para los tipos 31/33/51 de HPV, 8 (15.4%) fueron positivas por inmunohistoquímica. Estas diferencias de sensibilidad de la inmunohistoquímica en relación con los tipos virales detectados por HIS-tipado son estadísticamente significativas ($p < 10^{-6}$) cuando se consideran globalmente, pero no lo son cuando se consideran sólo los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV.

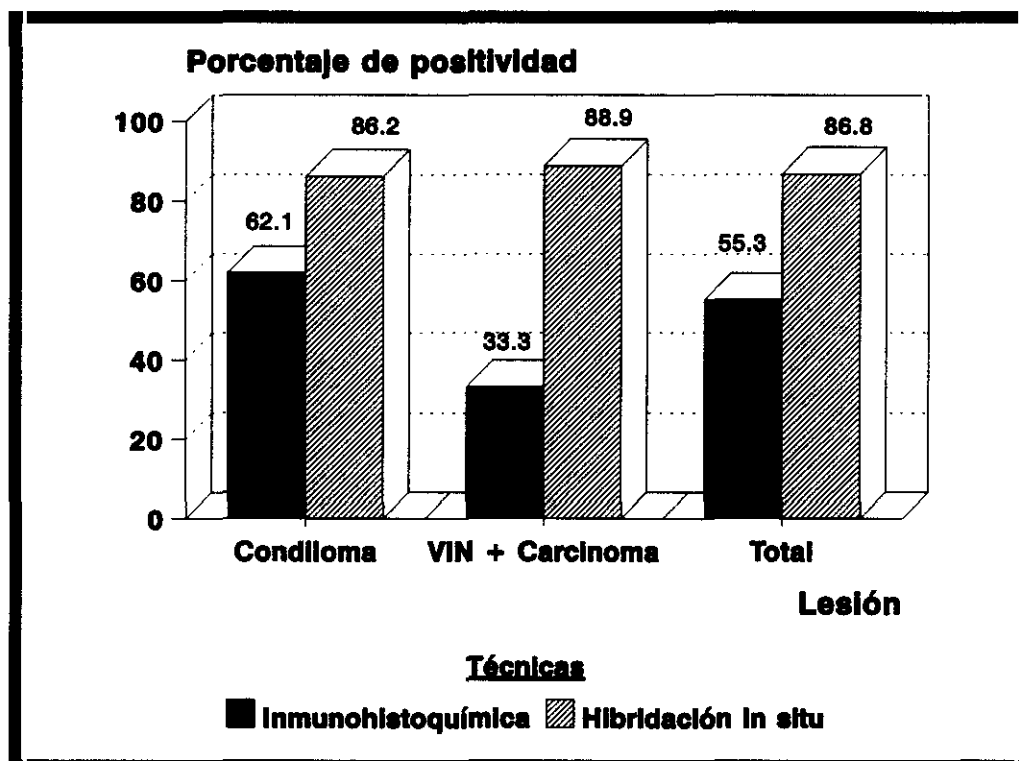


Figura IV.40. Resultados porcentuales de positividad con inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en biopsias de vulva.

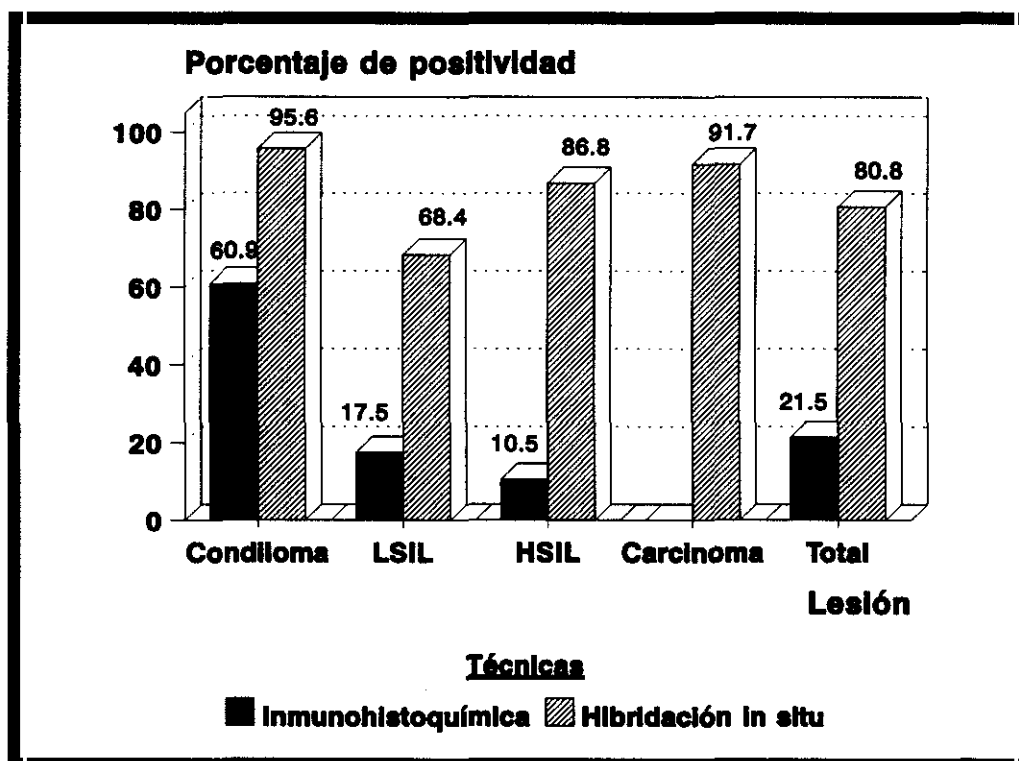


Figura IV.41. Resultados porcentuales de positividad con inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en biopsias de cérvix.

Hay también una clara diferencia entre ambas técnicas cuando se comparan las reacciones positivas obtenidas sobre una misma pieza, ya que el número de células positivas por hibridación *in situ* es en todos los casos mucho mayor que el de células positivas por inmunohistoquímica (fig.42).

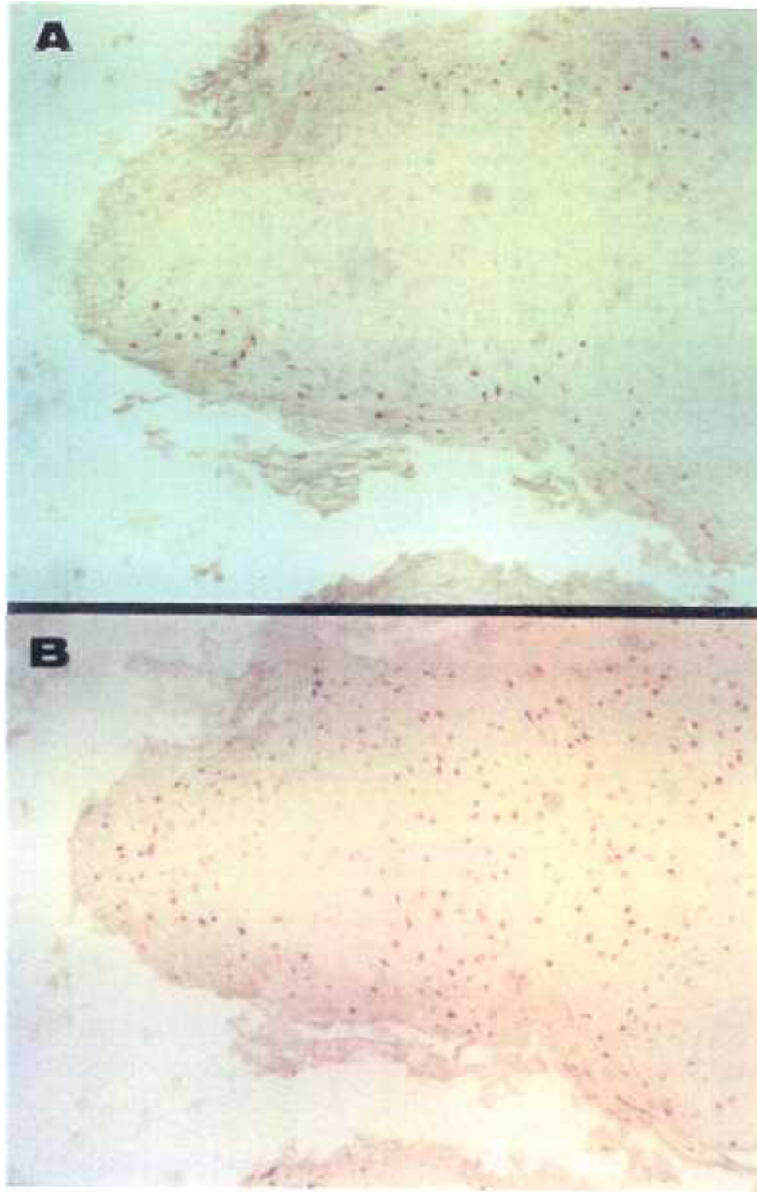


Figura IV.42. Comparación de las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* para HPV en un condiloma acuminado de vulva.

A) Reacción positiva con inmunohistoquímica que afecta exclusivamente a células coilocíticas del tercio superior del epitelio.
B) Reacción positiva para los tipos 6/11 de HPV por hibridación *in situ*. El número de células positivas es muy superior al detectado con inmunohistoquímica.

IV.6.2. COMPARACION ENTRE BIOPSIAS COMPATIBLES Y NO COMPATIBLES HISTOPATOLOGICAMENTE CON INFECCION POR HPV.

Los resultados obtenidos con inmunohistoquímica e HIS-detección, por lesiones, en piezas de vulva y cérvix, histopatológicamente compatibles o no compatibles con infección por HPV, se reflejan en las tablas IV.XXX y IV.XXXI. La prueba de χ^2 aplicada a los totales obtenidos en cérvix uterino indica que no hay diferencia significativa en los resultados obtenidos con hibridación *in situ* en ambos tipos de muestras; sí es, en cambio, significativa la diferencia observada en los resultados de inmunohistoquímica ($p < 0.04$).

Los resultados obtenidos con la técnica de HIS-tipado en biopsias cervicales según esta característica histológica se muestran en la tabla IV.XXXII; y en las figuras IV.43 y IV.44 se comparan los resultados obtenidos con hibridación *in situ* en relación con los patrones de marcaje y distribución de células positivas, respectivamente. Estadísticamente hay diferencia significativa ($p < 0.04$) en la distribución de los grupos de HPV estudiados en ambos tipos de muestras (compatibles y no compatibles histopatológicamente con infección por HPV), así como en los porcentajes de patrones de marcaje ($p < 0.04$). Por el contrario, no hay diferencia significativa cuando se consideran los patrones de distribución de células positivas por hibridación *in situ*.

TECNICA	LESION									
	Condiloma		VIN I		VIN II		Carcinoma		Total	
	HPV ¹ (n=29)	No HPV ² (---)	HPV (n=2)	No HPV (n=1)	HPV (n=2)	No HPV (n=1)	HPV (---)	No HPV (n=3)	HPV (n=33)	No HPV (n=5)
IHQ +	18 (62.1%)	---	1	---	1	---	---	1	20 (60.6%)	1
HIS +	25 (86.2%)	---	1	1	2	1	---	3	28 (84.8%)	5

¹ Compatible histopatológicamente con infección por HPV.

² No compatible histopatológicamente con infección por HPV.

Tabla IV.XXX. Resultados de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en biopsias de vulva según el criterio histológico de compatibilidad con infección por HPV.

TECNICA	LESION									
	Condiloma		LSIL		HSIL		Carcinoma		Total	
	HPV ¹ (n=23)	No HPV ² (---)	HPV (n=54)	No HPV (n=3)	HPV (n=34)	No HPV (n=4)	HPV (---)	No HPV (n=12)	HPV (n=111)	No HPV (n=19)
IHQ +	14 (60.8%)	---	10 (18.5%)	---	4 (11.7%)	---	---	---	28 (36.9%)	---
HIS +	22 (95.6%)	---	37 (68.5%)	2	30 (88.2%)	3	---	11 (91.7%)	89 (80.1%)	16 (84.2%)

¹ Compatible histopatológicamente con infección por HPV.

² No compatible histopatológicamente con infección por HPV.

Tabla IV.XXXI. Resultados de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en biopsias de cérvix según el criterio histológico de compatibilidad con infección por HPV.

COMPATIBILIDAD CON INFECCION POR HPV	TIPO VIRAL			
	6/11	16/18	31/33/51	Otros
Compatible (n=89)	31 (34.8%)	26 (29.2%)	36 (40.4%)	6 (6.7%)
No compatible (n=16)	---	5 (31.2%)	10 (62.5%)	2 (12.5%)

Tabla IV.XXXII. Resultados de la técnica de HIS-tipado para HPV en biopsias cervicales, según el criterio histopatológico de compatibilidad con infección por HPV.

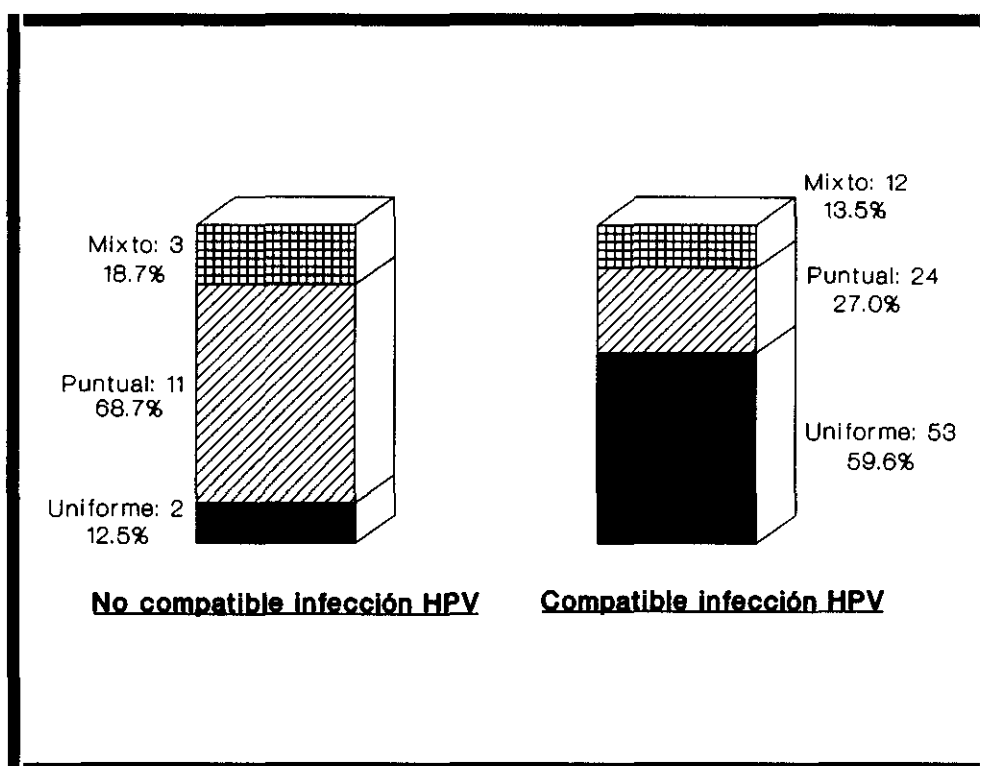


Figura IV.43. Distribución de patrones de marcaje por hibridación *in situ* en biopsias cervicales compatibles y no compatibles con infección por HPV.

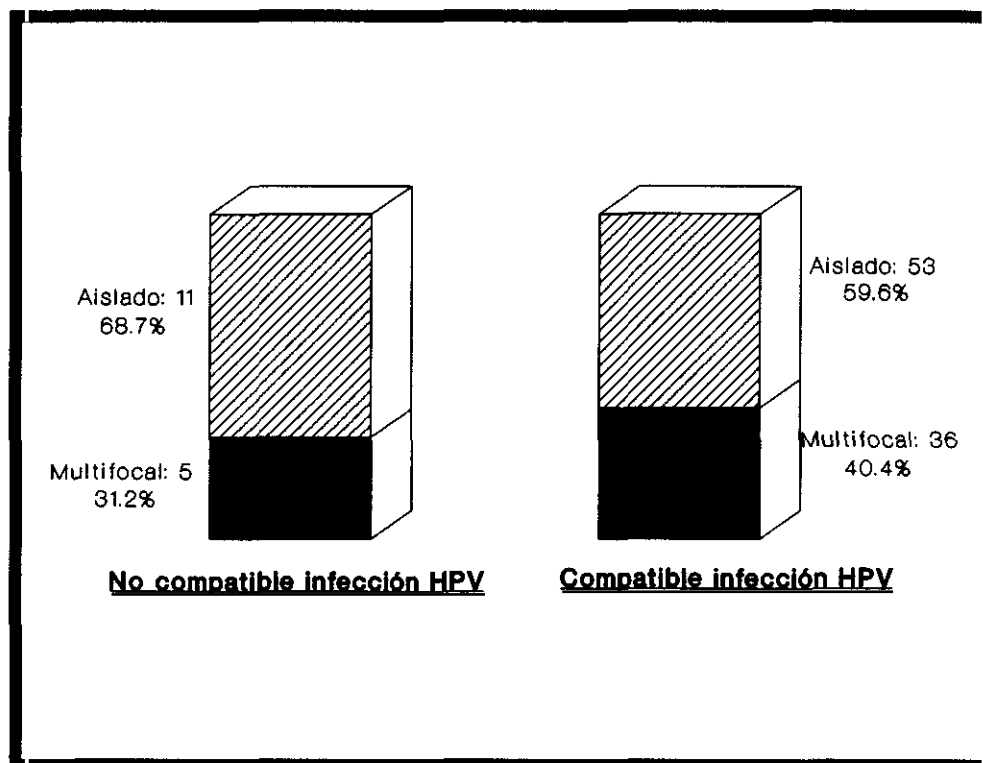


Figura IV.44. Relación entre compatibilidad histológica con infección por HPV y patrón de distribución por hibridación *in situ* en biopsias cervicales.

IV.6.3. COMPARACION ENTRE MUESTRAS DE ARCHIVO Y MUESTRAS DE NUEVA OBTENCION.

Los resultados obtenidos con inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en piezas de vulva y cérvix, según que éstas procedan de un archivo de anatomía patológica o sean de nueva obtención, se detallan en las tablas IV.XXXIII y IV.XXXIV. En ningún caso hay diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos con ambas técnicas, tanto cuando se consideran los totales como cuando se consideran los tipos de lesión por separado (condiloma acuminado en vulva y condiloma acuminado, LSIL y HSIL en cérvix uterino).

TECNICA	LESION									
	Condiloma		VIN I		VIN II		Carcinoma		Total	
	Archivo (n=21)	Nuevas (n=8)	Archivo (n=1)	Nuevas (n=2)	Archivo (n=1)	Nuevas (n=2)	Archivo (n=3)	Nuevas	Archivo (n=26)	Nuevas (n=12)
IHQ +	13 (61.9%)	5 (62.5%)	---	1	---	1	1	---	14 (53.8%)	7 (58.3%)
HIS +	19 (90.4%)	6 (75%)	1	1	1	2	3	---	24 (92.3%)	9 (75%)

Tabla IV.XXXIII. Resultados de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en biopsias de vulva según que procedan de archivo o sean de nueva obtención.

TECNICA	LESION									
	Condiloma		LSIL		HSIL		Carcinoma		Total	
	Archivo (n=6)	Nuevas (n=17)	Archivo (n=26)	Nuevas (n=31)	Archivo (n=25)	Nuevas (n=13)	Archivo (n=11)	Nuevas	Archivo (n=69)	Nuevas (n=61)
IHQ +	5 (83.3%)	9 (52.9%)	5 (19.2%)	5 (16.1%)	2 (8%)	2 (15.3%)	---	---	12 (17.4%)	16 (26.2%)
HIS +	6 (100%)	16 (94.1%)	20 (76.9%)	19 (61.2%)	21 (84%)	12 (92.3%)	11 (91.7%)	---	58 (84.1%)	47 (77%)

Tabla IV.XXXIV. Resultados de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en biopsias de cérvix uterino según que procedan de archivo o sean de nueva obtención.

IV.6.4. PROCEDENCIA GEOGRAFICA.

En las tablas IV.XXXV, IV.XXXVI y IV.XXXVII se muestran, respectivamente, los resultados obtenidos por inmunohistoquímica, HIS-detección e HIS-tipado para HPV en biopsias cervicales según su procedencia geográfica. No hay diferencia significativa entre los porcentajes de positividad obtenidos con ambas técnicas ni entre las distribuciones de los distintos grupos virales por procedencias.

PROCEDENCIA	LESION									
	Condiloma		LSIL		HSIL		Carcinoma		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
AVILA ¹	3	---	5	16	2	18	---	2	10	36
SALAMANCA ²	2	1	---	5	---	5	---	10	2	21
GUADALAJARA ³	---	4	1	8	1	4	---	---	2	16
AY. MADRID ⁴	2	1	---	2	---	2	---	---	2	5
CPF MADRID ⁵	7	3	4	16	1	5	---	---	12	24

¹ Hospital de la Seguridad Social Nuestra Señora de Sonsoles de Avila.

² Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

³ Centro de Orientación Familiar de Guadalajara.

⁴ Centros de Salud del Ayuntamiento de Madrid.

⁵ Centro Penitenciario Femenino de Madrid.

Tabla IV.XXXV. Resultados de inmunohistoquímica para HPV en biopsias cervicales según la procedencia de la pieza y la lesión diagnosticada.

PROCEDENCIA	LESION									
	Condiloma		LSIL		HSIL		Carcinoma		Total	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
AVILA ¹	3	---	16	5	16	4	2	---	37	9
SALAMANCA ²	3	---	4	1	5	---	9	1	21	2
GUADALAJARA ³	4	---	6	3	4	1	---	---	14	4
AY. MADRID ⁴	3	---	1	1	2	---	---	---	6	1
CPF MADRID ⁵	9	1	12	8	6	---	---	---	27	9

¹ Hospital de la Seguridad Social Nuestra Señora de Sonsoles de Avila.

² Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

³ Centro de Orientación Familiar de Guadalajara.

⁴ Centros de Salud del Ayuntamiento de Madrid.

⁵ Centro Penitenciario Femenino de Madrid.

Tabla IV.XXXVI. Resultados de HIS-detección para HPV en biopsias cervicales según la procedencia de la pieza y la lesión diagnosticada.

PROCEDENCIA	TIPO VIRAL			
	6/11	16/18	31/33/51	Otros
AVILA ¹	11	8	15	5
SALAMANCA ²	5	8	10	---
GUADALAJARA ³	3	5	6	1
AY. MADRID ⁴	3	1	2	---
CPF MADRID ⁵	9	9	13	1

¹ Hospital de la Seguridad Social Nuestra Señora de Sonsoles de Avila.

² Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

³ Centro de Orientación Familiar de Guadalajara.

⁴ Centros de Salud del Ayuntamiento de Madrid.

⁵ Centro Penitenciario Femenino de Madrid.

Tabla IV.XXXVII. Resultados de la técnica de HIS-tipado para HPV en biopsias cervicales, según la procedencia geográfica de las piezas.

IV.7. TECNICA DE DOBLE MARCAJE.

Tras la realización de la técnica se pueden observar en el tejido tres tipos celulares (figs. IV.45 y IV.46):

1. Células con núcleos de color negro, positivas por inmunohistoquímica e hibridación *in situ*. En la mayoría de estas células, el color negro debido al oro coloidal amplificado con plata enmascara el color rojo de la reacción positiva por hibridación. Las células con una positividad débil por inmunohistoquímica presentan núcleos con un punteado negro sobre fondo rojizo.
2. Células con núcleos rojos, negativas por inmunohistoquímica y positivas por hibridación *in situ*.
3. Células con núcleos azul pálido, negativas por ambas técnicas. La coloración es debida al colorante de contraste (hematoxilina de Harris).

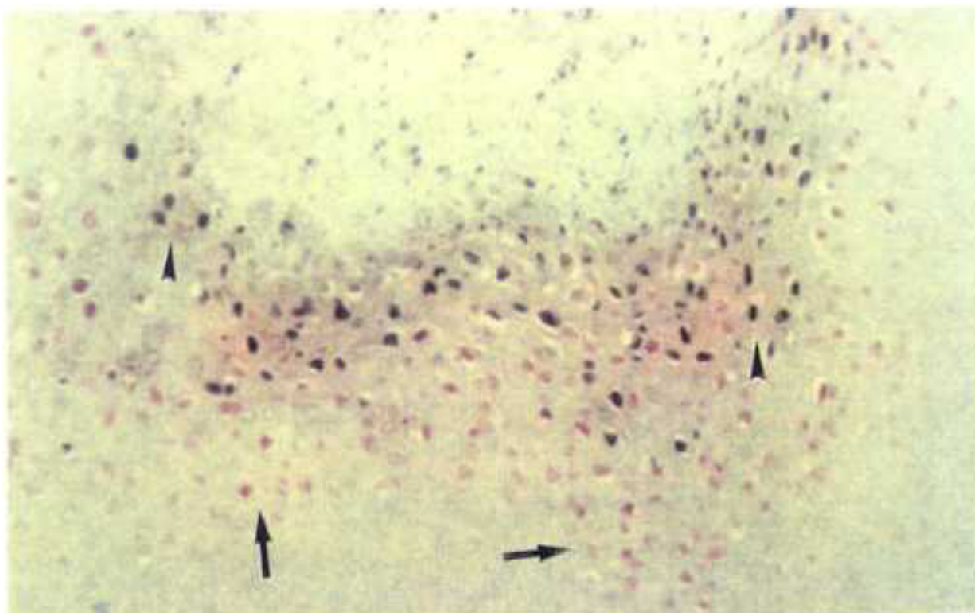


Figura IV.45. Combinación de las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* para HPV en una biopsia de cérvix. Las células positivas por inmunohistoquímica presentan los núcleos de color negro (flecha corta). Las células con núcleos de color rojo son positivas para los tipos 31/33/51 de HPV por hibridación *in situ* (flecha larga). (x 200).

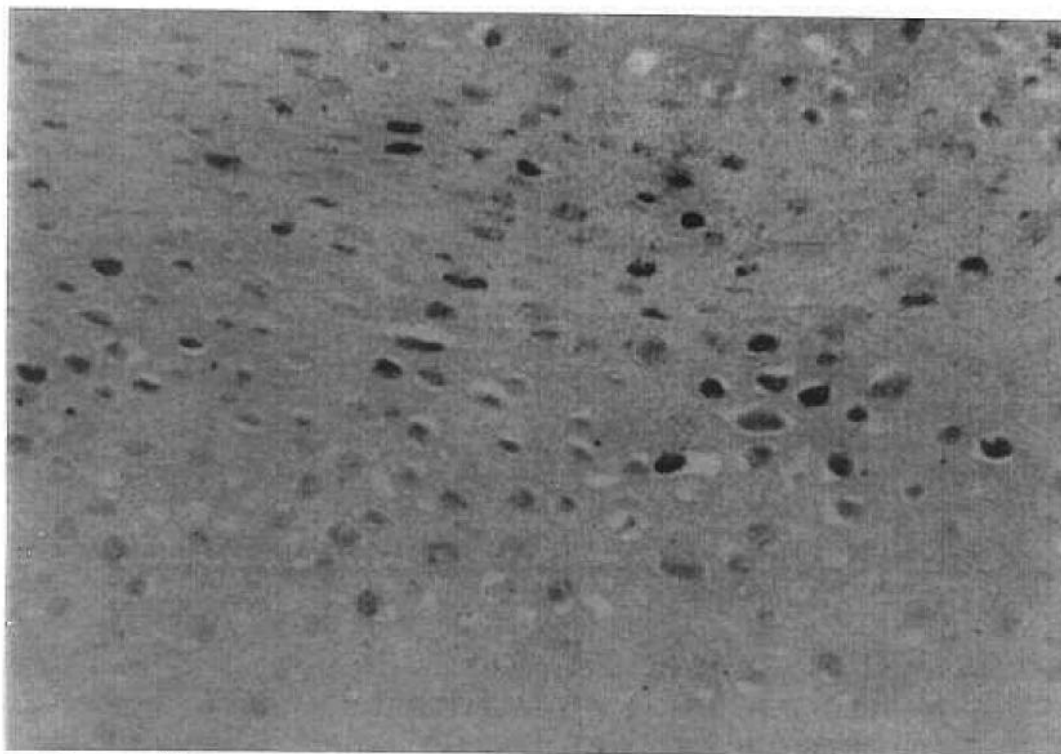


Figura IV.46. Detalle del doble marcaje obtenido al realizar secuencialmente las técnicas de inmunohistoquímica e HIS-tipado para los tipos 6/11 de HPV en un condiloma acuminado de vulva.

V. DISCUSSION

Antes de pasar a comentar en profundidad los resultados obtenidos conviene hacer dos consideraciones previas:

* La primera hace referencia al establecimiento de la sensibilidad y especificidad de las técnicas utilizadas. La forma más directa de calcularlas es la comparación con una técnica de referencia. En nuestro caso esto hubiese supuesto un grave inconveniente, ya que la técnica considerada de referencia en el diagnóstico de la infección por HPV es el Southern blot⁷² y en un laboratorio de anatomía patológica no hay infraestructura para realizarla. Además, la supremacía del Southern blot como técnica de referencia empieza a cuestionarse por varios motivos:

- El desarrollo de técnicas más sensibles, como la PCR²⁸⁷.
- La obtención de resultados contradictorios en varios laboratorios con experiencia en Southern blot utilizando las mismas muestras.³¹³
- La existencia de muestras positivas para HPV por hibridación *in situ* y negativas por Southern blot, debido a la presencia de muy pocas células infectadas pero con un elevado número de copias^{276,277,314,315}.

Por estas razones, hemos preferido estudiar la sensibilidad y especificidad de nuestras técnicas de una manera indirecta, combinando dos estrategias:

Por un lado, el empleo de líneas celulares con un número conocido de copias del genoma de HPV integradas en su propio genoma, lo que nos permite obtener un valor aproximado de la sensibilidad en términos absolutos (número mínimo de copias del genoma de HPV/célula para obtener un resultado positivo).

Por otro lado, la utilización de muestras control con lesiones no asociadas a HPV. Esto nos permite calcular la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo de la inmunohistoquímica e hibridación *in situ* respecto del diagnóstico histopatológico, considerando las biopsias diagnosticadas

de condiloma acuminado como HPV positivas por histopatología y las biopsias con lesiones no asociadas a HPV como negativas por histopatología. No se han considerado las biopsias diagnosticadas de SIL compatible o no con infección por HPV para realizar estos cálculos porque, como se discutirá más adelante, probablemente un porcentaje de SIL histopatológicamente compatible con infección por HPV tienen otra etiología distinta y viceversa, algunos SIL histopatológicamente no compatibles con infección por HPV son producidos por este virus.

Tampoco se han empleado muestras correspondientes a epitelio de distintas áreas genitales sin alteraciones por las implicaciones éticas que supone tomar biopsias a mujeres sanas sin ningún hallazgo previo que haga sospechar la presencia de una patología (imagen colposcópica anómala, citología cérvico-vaginal alterada, etc.). Además, diversos autores¹⁰⁵⁻¹¹⁶ han detectado la presencia de genomas de HPV en epitelio normal de personas asintomáticas en porcentajes que oscilan entre el 4.5%¹⁰⁹ y el 29%¹⁰⁷ de la población estudiada, por lo que el empleo de este tipo de muestras como control negativo debería evitarse.

* La segunda consideración hace referencia a la forma en que se han presentado los resultados, separados siempre en piezas de vulva y cérvix uterino.

Los resultados obtenidos con inmunohistoquímica e hibridación in situ están relacionados con el comportamiento del virus en cada lesión. Este comportamiento puede estar influenciado por las características histológicas del tejido infectado y por los diferentes microambientes presentes en las distintas áreas del tracto genital inferior femenino. Por este motivo, hemos preferido separar los resultados en vulva y cérvix y no desarrollar también los resultados globales, que además de hacer sumamente tediosa la presentación de este apartado del trabajo, podrían inducir a conclusiones erróneas. Sólo se han considerado conjuntamente en aquellas ocasiones en las que la ausencia de significación al aplicar un test estadístico puede ser debida a un número insuficiente de casos y en las que además no se han observado discrepancias en los resultados obtenidos en ambas localizaciones anatómicas.

Una vez hechos estos dos comentarios, el resto de la discusión se estructura siguiendo los mismos epígrafes en que se dividió el capítulo de resultados, para hacer al final unas consideraciones globales.

V.1. CLASIFICACION DE LAS LESIONES.

El primer problema en el planteamiento del presente estudio fue la clasificación de las lesiones cervicales. Tras varias consideraciones optamos por una clasificación propia, basada en el sistema de Bethesda^{96,166,167} (LSIL y HSIL), pero considerando el condiloma acuminado como una entidad diagnóstica independiente de LSIL, ya que tiene unas características histopatológicas muy bien diferenciadas respecto del resto de lesiones de bajo grado y es una lesión claramente benigna que, salvo en muy raras excepciones, no evoluciona hacia malignidad.

Dos son principalmente las razones que motivaron la elección del sistema de Bethesda como base para esta clasificación:

- Por un lado, desde un punto de vista semántico, la denominación "lesión intraepitelial escamosa" define mejor el tipo de lesión que nos ocupa que la denominación "neoplasia intraepitelial". El término "neoplasia" tiene connotaciones de crecimiento y por consiguiente de invasión. Es verdad que estas lesiones tienen una potencialidad de evolución maligna, pero esto no implica que todas ellas conduzcan a una verdadera neoplasia invasiva. De hecho, un porcentaje elevado de lesiones persisten sin evolucionar e incluso remiten espontáneamente sin necesidad de tratamiento³⁰⁴. Es preferible, por ello, hablar de lesión intraepitelial originada por una alteración en las células escamosas, bien por una infección vírica, bien por otras etiologías.

- Por otro lado, el sistema de Bethesda es el que mejor se ajusta a una de las principales finalidades de este trabajo: la orientación pronóstica sobre la evolución de una lesión. En las lesiones de alto grado (HSIL) se acepta

universalmente la aplicación de tratamientos agresivos¹⁰⁰ (láser, cirugía), independientemente de factores pronósticos; pero en las lesiones de bajo grado (LSIL) en las que el clínico puede optar entre un amplio abanico de posibilidades terapéuticas¹⁰⁰ (resinas de podofilino, criocoagulación, electrocoagulación, interferón, láser, etc.) es donde esa orientación pronóstica puede influir en la elección del tratamiento más adecuado. Con el sistema de clasificación CIN, el problema surge con los CIN II, tanto a nivel diagnóstico, por estar a caballo entre el CIN I y el CIN III (lo que en ocasiones se soluciona con diagnósticos mixtos: CIN I-II, CIN II-III), como a nivel de decisiones terapéuticas.

En las piezas de vulva hemos mantenido la terminología VIN, por no estar todavía perfectamente definidos los criterios histopatológicos de LSIL y HSIL en esta localización anatómica. En aquellos casos en que ha sido necesario considerar los resultados globalmente para aumentar la significación estadística, se han seguido los criterios de Crum y Nuovo⁹⁶ y se han considerado las lesiones diagnosticadas de VIN I como LSIL y las diagnosticadas de VIN II como HSIL.

Otro aspecto que conviene resaltar es la idoneidad de las muestras utilizadas con lesiones asociadas a HPV en función de los objetivos que se persiguen. En piezas de vulva, dado el escaso número de lesiones displásicas diagnosticadas (3 VIN I y 3 VIN II), sólo son representativos los resultados obtenidos en condilomas acuminados y, por tanto, no se han podido realizar estudios con fines pronósticos. En cérvix uterino, en cambio, la distribución de las lesiones ha permitido realizar estudios más amplios. Como se puede observar en la figura IV.3 el porcentaje mayoritario de piezas fue diagnosticado de SIL (78.9%) y fueron minoritarias las piezas diagnosticadas de condiloma acuminado (14.4%) y carcinoma (6.7%). Esta aparente desigualdad en los porcentajes de las diferentes lesiones tiene, sin embargo, su explicación lógica: en las lesiones benignas y malignas se espera obtener resultados homogéneos, con lo que con un número menor de muestras, éstas pueden ser representativas. En los SIL, en cambio, se espera una mayor heterogeneidad, por lo que el número de muestras tiene que ser mayor para que los resultados sean representativos, sobre todo para abordar consideraciones de tipo pronóstico.

Un pequeño inconveniente ha sido el escaso número de carcinomas, que si bien ha sido suficiente para obtener resultados estadísticamente significativos en la mayor parte de los estudios, en algunos ha sido necesario considerar los resultados globalmente (vulva + cérvix) para conseguir esa significación estadística, y en los menos ha obligado a hablar de "tendencia" en lugar de significación estadística. Sin embargo, no ha sido posible obtener más muestras con este tipo de lesión, ya que en el período de estudio y en los centros que colaboraron en la obtención de nuevas muestras no se diagnosticó ningún carcinoma y en los archivos de anatomía patológica consultados no se podía garantizar que en fechas anteriores a las revisadas las condiciones de fijación de las piezas fuesen las idóneas para la realización de técnicas de hibridación *in situ*.

Un punto importante en la clasificación de las lesiones es la distinción entre biopsias histopatológicamente compatibles y no compatibles con infección por HPV. Los condilomas acuminados son, por definición, la consecuencia de la infección productiva por HPV, por lo que todos han sido considerados compatibles. De hecho no se ha descrito todavía ningún otro agente etiológico que produzca lesiones similares.

En el resto de las lesiones se debe evitar el empleo de la coilocitosis como único criterio histopatológico patognomónico de infección por HPV, ya que otros agentes infecciosos (tricomonas, candidas, *Gardenerella vaginalis*) pueden también producirla en mayor o menor grado¹¹⁷. Por ello, los criterios de compatibilidad con infección por HPV deben incluir además la observación de otras dos de las siguientes características histopatológicas: binucleación y/o multinucleación, disqueratosis, papilomatosis y contorno nuclear irregular.

En el caso de las piezas diagnosticadas de carcinoma el estudio de compatibilidad con infección por HPV se ha llevado a cabo no sólo en la masa de células neoplásicas, sino también en los fragmentos de epitelio adyacentes a la lesión invasiva, a pesar de lo cual ninguna de las muestras con este diagnóstico cumple los requisitos mencionados anteriormente y, en consecuencia, se han considerado no compatibles.

Finalmente, hay que mencionar las diferencias encontradas en la distribución de lesiones en muestras de archivo y de nueva obtención (figura IV.5): mientras que todos los carcinomas se diagnosticaron en piezas de archivo, en las de nueva obtención predominan los condilomas acuminados y LSIL. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que los archivos de anatomía patológica revisados corresponden a centros hospitalarios y las piezas de nueva obtención se obtuvieron en consultas de ginecología extrahospitalarias. La mayoría de las pacientes con lesiones asociadas a HPV que acuden a estas consultas presenta lesiones benignas o SIL de bajo grado y son tratadas de manera ambulatoria, sin remitirse al hospital; por el contrario, el número de pacientes con HSIL y carcinoma es muy bajo y habitualmente se remiten al hospital correspondiente para efectuar tratamientos más agresivos (láser o cirugía). De esta forma los hospitales, al nutrirse de pacientes procedentes de múltiples consultas de ginecología, realizan un efecto de concentración de este tipo de lesiones, que se refleja en sus archivos de anatomía patológica.

V.2. LONGITUD DE EPITELIO.

La idea de que la longitud del epitelio presente en una biopsia ginecológica puede influir en la obtención de un resultado falso negativo con la técnica de hibridación *in situ* surgió de nuestra propia experiencia con esta técnica, ya que no hemos encontrado ninguna referencia en la literatura revisada al respecto. Así, mientras que en algunas biopsias el número de células positivas es muy elevado y su distribución a lo largo del epitelio más o menos uniforme o parcheada, en otras el número de células positivas es muy reducido y se encuentran muy separadas unas de otras en el epitelio; incluso en algunas biopsias se observa una única célula claramente positiva.

Para comprobar esta hipótesis lo mejor es comparar los resultados obtenidos con hibridación *in situ* en piezas con distinta longitud de epitelio, para lo que previamente hace falta realizar esta medida en cada biopsia. La técnica

elegida, el análisis de imagen, creemos que es la mejor para efectuar las medidas con el máximo de precisión. El software utilizado (programa MIP de Microm España) presenta dos características interesantes: por un lado permite calibrar el sistema con un portaobjetos graduado, de manera que el resultado de las medidas se exprese en milímetros; por otro lado permite trazar una línea interactiva sobre una imagen y calcula automáticamente la distancia entre los dos extremos y el camino recorrido.

Otra característica importante es que las imágenes obtenidas con la cámara de TV acoplada al microscopio son cuadradas, por lo que en aquellas biopsias en las que el epitelio ocupa más de un campo se pueden captar varias imágenes sucesivas que permitan reconstruir toda la pieza sin pérdida de ningún fragmento entre campo y campo.

Ahora bien, ¿a qué altura del epitelio es preferible realizar la medida? Nosotros hemos considerado que la medida a nivel de la capa basal de células es la forma más objetiva de obtener este dato para poder efectuar estudios comparativos, ya que el resto de los estratos del epitelio se ven afectados por alteraciones causadas por la propia infección vírica, como acantosis y papilomatosis.

En el caso de lesiones invasivas, en las que la capa basal de células no está conservada, lo más práctico es efectuar una medida aproximada por campos, calibrando previamente el microscopio con un portaobjetos graduado. En nuestro caso un campo de 100 aumentos (10x10) equivale a un diámetro de 1.6 mm, por lo que 6-7 campos equivalen a 10 mm de epitelio.

Para poder tabular y estudiar resultados posteriores en relación con la longitud de epitelio las biopsias se agruparon en clases de 1 mm de amplitud, desde longitudes inferiores a 2 mm hasta 10 mm. Todas las biopsias cuyo epitelio medía más de 10 mm se agruparon en una sola clase, independientemente de su longitud, pues consideramos, según también nuestra propia experiencia, que 1 cm de epitelio constituye una longitud suficientemente representativa para que

el número de falsos negativos por hibridación *in situ* en función de la longitud de epitelio sea mínimo. De hecho, los resultados obtenidos posteriormente confirman esta idea.

Todas las muestras cervicales con lesiones no asociadas a HPV tenían mas de 10 mm de epitelio, punto importante si tenemos en cuenta que iban a ser usadas como controles.

V.3. INMUNOHISTOQUIMICA.

El equipo de reactivos utilizado se basa en el método avidina-biotina-enzima y su elección se fundamentó en dos razones:

1. Su mayor sensibilidad frente al método clásico de peroxidasa-antiperoxidasa, tanto en general²³⁶, como en el caso particular de la detección de HPV en tejido de cérvix uterino, como han demostrado Alessandri y cols.²³⁷.
2. Su perfecta adaptación a metodologías basadas en el "transporte capilar de reactivos"³¹², que tienen la ventaja de que los lavados son muy rápidos y muy enérgicos, con lo que se consigue un considerable ahorro de tiempo y eliminar, prácticamente en su totalidad, los problemas de "tinción de fondo" en las preparaciones.

La sensibilidad respecto del diagnóstico histopatológico en condilomas acuminados, 53.8%, es baja para considerar la inmunohistoquímica como una buena técnica en la que basar el diagnóstico de esta infección. Ahora bien, dado que la especificidad y el valor predictivo positivo son del 100%, sí se puede utilizar como técnica complementaria, teniendo siempre en cuenta que un resultado negativo no es concluyente (66.7% de valor predictivo negativo). Por supuesto, no podemos extrapolar estos valores al resto de lesiones, ya que la

sensibilidad de la inmunohistoquímica está influenciada por el tipo de infección, productiva o no productiva, que ha originado una lesión.

El anticuerpo policlonal utilizado como primario reacciona de forma cruzada con la proteína estructural mayoritaria de la cápside de todos los tipos de HPV, por lo que, en teoría, es útil para diagnosticar infecciones productivas. De hecho, Ferenczy y cols.⁴⁶, Kadish y cols.²¹⁸ y Morin y cols.¹³² han demostrado en sendos estudios una correlación prácticamente del 100% entre positividad antigénica por inmunohistoquímica y observación de partículas víricas por microscopía electrónica.

Esto explica el resultado negativo obtenido en las tres líneas celulares, procedentes de carcinomas cervicales y que contienen un número variable de copias de HPV de los tipos 16 (CaSki y SiHa) y 18 (HeLa) integradas en su genoma. Estas líneas se caracterizan por expresar proteínas reguladoras específicas de HPV^{232,309}, sobre todo las codificadas por las regiones E6 y E7, pero en ningún caso se ha descrito que haya síntesis de proteínas estructurales ni producción de nuevos viriones. Es lógico, por tanto, que se obtenga un resultado negativo por inmunohistoquímica, pues el anticuerpo no da reacción cruzada con proteínas víricas reguladoras.

Los resultados obtenidos en condilomas acuminados de vulva y cérvix uterino (58.1% y 53.8%, respectivamente) están en consonancia con los publicados por diversos autores, que oscilan alrededor del 50% de positividad. Como ejemplos, Schadendorf y cols.³¹⁶ obtuvieron una positividad del 69%, Wilbur y cols.¹¹⁹ del 55% y Bejui-Thivolet y cols.³¹⁷ del 22.2%, aunque en este estudio las piezas estaban fijadas con solución de Bouin, por lo que sus resultados no son perfectamente comparables con los nuestros.

En España, Jou y cols.³¹⁸ obtuvieron un resultado inmunohistoquímico positivo en el 39.5% y 60% de condilomas acuminados de vulva y cérvix, respectivamente, y Ochotorena³¹⁹, en un reciente estudio realizado en la Comunidad Autónoma de Murcia, detectó antígenos de HPV en un 32.7% de

condilomas acuminados cervicales.

Coincidiendo con lo publicado por la mayoría de los autores, el porcentaje de positividad es menor en lesiones displásicas que en condilomas y es mínimo en carcinomas. En nuestro trabajo hemos obtenido el mismo resultado en LSIL y HSIL (11.1% y 11.5%, respectivamente). Estos porcentajes son ligeramente inferiores a los publicados por Bitterman y Jenson¹¹⁸ en displasias leves (30%) y similares en displasias moderadas (16%) y severas (3%).

La serie presentada por Ochotorena³¹⁹ es muy similar a la nuestra, ya que detecta antígenos víricos en el 10% de biopsias diagnosticadas de CIN I y en el 17.2% de CIN II y CIN III, mientras que los resultados de Jou y cols.³¹⁸ son ligeramente superiores, con un 32.3% de positividad en CIN I y un 16% en CIN II y CIN III. Sin embargo, dado que estos autores estudian sólo biopsias que cumplen los criterios de compatibilidad con infección por HPV, sus resultados no son perfectamente comparables con los nuestros.

En lesiones malignas sólo una biopsia de carcinoma epidermoide de vulva presentó inmunorreactividad. Hay que señalar, que la positividad se observó en dos células de una región de epitelio adyacente al carcinoma con evidencia de VIN y en ningún caso en células de la masa neoplásica. Esta peculiaridad ha sido también descrita por Hara y cols.³²⁰

En todos los casos positivos, independientemente de la lesión diagnosticada, el marcaje afectó casi exclusivamente a coilocitos y células disqueratóticas del tercio superior del epitelio, lo que apoya la idea de que es necesario un cierto grado de maduración celular para que se transcriban los genes tardíos estructurales del genoma vírico.

V.4. HIBRIDACION *IN SITU*.

V.4.1. TECNICA DE DETECCION.

La sensibilidad de la técnica de hibridación *in situ* depende de factores como el tipo de marcaje de las sondas (radioactivo o no radioactivo) y el número de pasos en que se realiza la detección de ese marcaje. El equipo que hemos utilizado contiene sondas marcadas con biotina y la detección se realiza en un solo paso con un complejo estreptavidina-biotina-fosfatasa alcalina. Con la técnica descrita en material y métodos hemos obtenido una reacción positiva en células HeLa, que, según Schwarz y cols.⁷⁸ y Mincheva y cols.³¹¹, contienen entre 10 y 50 copias integradas del genoma del HPV 18. En consecuencia, podemos afirmar que nuestra técnica tiene, por lo menos, una sensibilidad en valores absolutos de 50 copias de HPV/célula, aunque probablemente sea menor. Esta sensibilidad es mejor que la obtenida por Guerin-Reverchon³²¹, que necesita un sistema de detección en tres pasos para obtener un resultado positivo en células HeLa, y coincide con la calculada por Herrington y cols.³²² (33 copias de HPV/célula) en un estudio comparativo entre sondas marcadas con biotina y con digoxigenina, combinadas con sistemas de detección en uno y tres pasos, con fosfatasa alcalina y con peroxidasa.

En células CaSki obtuvimos una reacción positiva mucho más intensa que en células HeLa, como corresponde a un número de copias de HPV mucho mayor³¹¹ (400-600 copias de HPV 16/célula). El resultado negativo en células SiHa indica de forma obvia que nuestra técnica no es tan sensible como para detectar una o dos copias de HPV/célula³¹¹, por lo que en el conjunto de casos negativos se incluirá un porcentaje de falsos negativos que contengan un número muy bajo de copias de HPV/célula.

Los valores de sensibilidad y especificidad calculados para la HIS-detección respecto al diagnóstico histopatológico en condilomas acuminados de cérvix

(92.3% de sensibilidad y 100% de especificidad) indican que ésta si puede ser una técnica adecuada en la que basar el diagnóstico de infección por HPV, aunque con los datos que estamos manejando en este punto de la discusión es todavía prematuro extrapolar estos valores de sensibilidad y especificidad al resto de lesiones cervicales asociadas a HPV. Estos valores, no obstante, son muy parecidos e incluso en algunos parámetros mejores, a los obtenidos por Pao y cols.³¹⁴ comparando la hibridación *in situ* frente a Southern blot en material procedente de citologías exfoliativas: sensibilidad 93.3%, especificidad 84.2%, valor predictivo positivo 75.7% y valor predictivo negativo 96%.

Centrándonos en los resultados obtenidos con esta técnica en los distintos tipos de lesiones, el porcentaje de positividad obtenido en condilomas acuminados de vulva (80.7%) es superior al publicado por Bleiweiss y cols.³²³ (50%) y prácticamente igual al obtenido por Schadendorf y cols.³¹⁶ (76.9%) con el mismo equipo de reactivos y por Wilbur y cols.¹¹⁹ (83.3%) con sondas tritiadas de ARN antisentido. Esto apoya la idea de que las técnicas que utilizan sondas biotiniladas tienen la misma sensibilidad que las que utilizan sondas radioactivas. En este sentido, Unger y cols.³²⁴ y Nuovo y Richart²⁷⁵, en sendos estudios comparativos frente a sondas marcadas con ³⁵S, y Neumann y cols.²⁷⁸ frente a sondas marcadas con ³²P, concluyen que las sondas marcadas con biotina confieren la misma sensibilidad, e incluso mejor, que las sondas radioactivas a las técnicas de hibridación *in situ*.

Con respecto a las biopsias de cérvix, en la tabla V.I se comparan nuestros resultados con los obtenidos por otros autores que han utilizado también la hibridación *in situ* como técnica diagnóstica; en cada caso se señala el tipo de marcaje empleado y el tipo de muestra en el que realizaron el estudio.

AUTOR ¹	MARCAJE	MUESTRA	LESION			
			CONDILOMA	LSIL (CIN I)	HSIL (CIN II +CIN III)	CARCINOMA
Herrington ³²⁵	Digoxigenina	Citología	64.7%	75%		
Bejui-Thivolet ³¹⁷	Biotina	Biopsia	100%		44.6%	
Konno ³²⁶	Biotina	Biopsia			63.2%	
Thompson y Rose ³²⁷	³² p	Biopsia				53%
Faulkner-Jones ³²⁸	Biotina	Biopsia	46.2%	33.3%	76.9%	
Pao ³¹⁸	Biotina	Citología	84.4%	50%	76.9%	66.7%
Cooper ^{329, 330}	Digoxigenina	Biopsia			72.2%	68%
Cooper ^{329, 330}	Digoxigenina	Biopsia			44.9%	64%
Nuovo ³³¹	Biotina	Biopsia		89%	71%	
Meyer ³³²	Biotina	Cito/Biop		29%	69%	
Thomassen ³³³	Biotina	Biopsia			69%	
Gómez	Biotina	Biopsia	92%	52.2%	76.9%	91.7%

¹ Primer autor del trabajo.

Tabla V.I. Comparación de los resultados obtenidos por diversos autores con la técnica de hibridación *in situ* para HPV en muestras de cérvix uterino.

A la vista de esta tabla se pueden resaltar tres aspectos:

1. Nuestros resultados en condilomas y carcinomas son, en general, superiores a los obtenidos por otros autores. Esto no es de extrañar si tenemos en cuenta que, excepto Herrington y cols.³²⁵, ninguno de ellos realizó una técnica de HIS-detección, sino que los porcentajes de positividad reflejan la suma de todas las biopsias en las que se obtuvo un resultado positivo con alguna de las múltiples sondas utilizadas por cada investigador con técnicas de HIS-tipado (la mayoría utiliza sondas que cubren los tipos 6, 11, 16, 18, 31 y 33 de HPV).

En carcinomas los resultados de los diversos autores oscilan alrededor del 65%, excepto Thomson y Rose³²⁷, que obtienen un resultado positivo en un 53% de casos, debido probablemente a que las sondas que utilizaron no cubren los tipos 31 y 33 de HPV.

2. En LSIL es donde mayor heterogeneidad se observa en los resultados obtenidos por diversos autores (29%-89%), debido quizás a la aplicación de criterios distintos en el diagnóstico de este tipo de lesiones. Nosotros hemos obtenido un resultado positivo en el 52.2% de las biopsias, similar al publicado por Pao y cols.³¹⁴ en muestras citológicas (50%).
3. En HSIL los resultados publicados por la mayoría de los autores oscilan alrededor del 75% y coinciden con los obtenidos por nosotros (76.9%). Llama la atención el bajo porcentaje de positividad obtenido por Bejui-Thivolet y cols.³¹⁷ (44.6%) en SIL, que se puede justificar porque tampoco cubrieron los tipos 31 y 33 de HPV con sus sondas y emplearon biopsias fijadas en Bouin, que no es el fijador ideal para esta técnica, y por Cooper y cols.³²⁹ en HSIL (50%) en una población de Africa del Sur, de difícil explicación, si exceptuamos criterios de distribución geográfica de los distintos tipos virales.

Respecto de otras series españolas, nuestros resultados son ligeramente superiores a los encontrados en la bibliografía consultada. Aznar y cols.³³⁴ obtuvieron un 77% de casos positivos en condilomas acuminados; Riera y cols.³³⁵ un 47.6% en biopsias diagnosticadas de CIN I; Domínguez y cols.³³⁶ un 44.7% en CIN I y un 27% en CIN II + CIN III; y Ochotorena³¹⁹ un 52.7% en condilomas acuminados, un 12% en CIN I y un 37.2% en CIN II + CIN III. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se utilizó una técnica de detección.

Podemos finalizar este apartado de la discusión recalcando la importancia que tiene realizar una técnica de HIS-detección para confirmar la etiología por HPV de este tipo de lesiones, o en su defecto, si se efectúa solamente técnica de HIS-tipado, emplear un amplio abanico de sondas que cubran por lo menos los tipos de HPV más frecuentes en localizaciones genitales (tipos 6, 11, 16, 18, 31 y 33 de HPV).

V.4.1.1. Relación entre la técnica de HIS-detección para HPV y la longitud del epitelio presente en las biopsias.

Una vez realizada la medida de la longitud del epitelio presente en las biopsias con lesiones no invasivas asociadas a HPV y tabulados los resultados en clases de 1 mm de amplitud, se procedió a relacionar estos datos con los resultados obtenidos mediante HIS-detección. De esta forma se construyeron las tablas IV.X y IV.XI, en las que se recoge el número de biopsias positivas para HPV con respecto al número total de biopsias en cada clase. El análisis estadístico de estas tablas puede ser conflictivo por el reducido número de muestras que hay en algunas clases. Por ello se prefirió presentar estos datos gráficamente y agruparlos de manera que fuesen más representativos. Así en la figura IV.11 se ilustra el porcentaje de biopsias HPV-positivas con una longitud mínima de epitelio.

En el caso de piezas de vulva los mejores resultados se obtuvieron en

biopsias con más de 10 mm de epitelio (89.5%), pero a la vista de la gráfica, este parámetro no parece ser un factor importante a tener en cuenta para mejorar el rendimiento de la técnica, pues los porcentajes de positividad obtenidos se sitúan en la banda del 80-90%, independientemente de la longitud mínima de epitelio en las biopsias consideradas. Esta conclusión, sin embargo, no debería generalizarse a todas las piezas de vulva, ya que la muestra estudiada esta compuesta en un porcentaje mayoritario (77.5%) por condilomas acuminados, por lo que parece más aceptable concluir que en condilomas acuminados de vulva la longitud de epitelio no influye de forma significativa en el resultado obtenido mediante HIS-detección, aunque lo ideal es que la biopsia tenga más de 10 mm de epitelio. Esto es lógico, ya que como se ha mencionado en varias ocasiones, el condiloma acuminado es la manifestación clínica de una infección benigna productiva, en la que un porcentaje muy elevado de células está infectado y contienen un alto número de copias del genoma de HPV.

La situación es distinta en piezas de cérvix uterino. La gráfica se puede descomponer en tres tramos: un primer tramo, ascendente, en el que el porcentaje de positividad pasa de un 66.1% en biopsias con más de 1 mm de epitelio a un 79.7% en biopsias con más de 5 mm de epitelio; un segundo tramo en el que este porcentaje se estabiliza alrededor del 80-82%, entre biopsias con más de 5 mm y biopsias con más de 8 mm de epitelio; un tercer tramo en el que la positividad vuelve a subir, aunque ligeramente, hasta alcanzar valores alrededor del 85% en biopsias con más de 9 mm de epitelio. En este caso, sí parece haber una influencia de la longitud de epitelio en los resultados de la HIS-detección.

Para estudiar la significación estadística, las biopsias se agruparon en tres categorías: longitud de epitelio inferior a 5 mm, entre 5 y 9 mm y superior a 9 mm. Los puntos de corte (5 y 9) se eligieron a tenor de lo observado en la gráfica IV.8. Las diferencias entre los porcentajes de positividad en estos tres grupos (figura IV.13) son estadísticamente significativas, lo que implica una dependencia entre el resultado de la técnica de HIS-detección y la longitud de epitelio presente en las biopsias. Al considerar estas tres categorías por parejas se observan

diferencias significativas entre biopsias con menos de 5 mm de epitelio y aquellas con 5-9 mm o más de 9 mm. No hay diferencia significativa, sin embargo, entre biopsias con 5-9 mm y biopsias con más de 9 mm de epitelio. Esto nos permite concluir, en principio, que las biopsias de cérvix uterino deberían tener una longitud mínima de 5 mm de epitelio para reducir en lo posible el número de falsos negativos por tamaño inadecuado de la muestra, aunque lo ideal sería una longitud superior a 9 mm.

Para comprobar si esta conclusión general es válida para cada tipo de lesión cervical, se repitió el estudio por lesiones (figura IV.12).

En condilomas acuminados se comprueba una vez más que la longitud de epitelio no influye en los resultados de la HIS, pues se obtienen porcentajes de positividad por encima del 90% cualquiera que sea la longitud mínima considerada.

En LSIL la gráfica es prácticamente igual a la global de cérvix, aunque con resultados más bajos, con un primer tramo en que el porcentaje de biopsias HPV positivas aumenta desde el 52.2% hasta el 68.4% en biopsias con más de 5 mm de epitelio, un segundo tramo en el que la positividad se mantiene alrededor del 65-70% hasta biopsias con más de 9 mm de epitelio y un tercer tramo en que aumentan los resultados positivos hasta el 74.2% para biopsias con más de 10 mm de epitelio.

En HSIL los resultados de positividad son mejores, pero la forma de la gráfica es muy similar: una subida inicial desde el 76.9% al 85.4%, en este caso en biopsias con más de 4 mm de epitelio; una estabilización alrededor del 86-88% hasta biopsias con más de 6 mm; una nueva subida hasta valores próximos al 93% en biopsias con longitudes mínimas de 7 y 8 mm y, finalmente, un 100% de resultados positivos en biopsias con más de 9 mm.

Al agrupar las biopsias en tres categorías, respetando los mismos puntos de corte que en el estudio global (5 y 9), se comprueba que no hay diferencia

estadística significativa en condilomas acuminados, pero sí la hay en LSIL y HSIL. En consecuencia, la conclusión a que se llegó al estudiar todas las biopsias de cérvix conjuntamente puede extenderse a biopsias diagnosticadas de LSIL y HSIL, con ligeras matizaciones: en LSIL la longitud ideal sería de 10 mm en lugar de 9 mm y en HSIL la longitud mínima puede rebajarse a 4 mm.

En la literatura consultada no hemos encontrado ningún trabajo que haga referencia a la importancia que el tamaño de una biopsia puede tener para reducir en lo posible el número de falsos negativos y, en consecuencia, mejorar el valor predictivo negativo de la hibridación *in situ*, por lo que no hemos podido contrastar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores en este sentido.

V.4.2. TECNICA DE TIPADO.

La técnica de HIS-tipado se ha realizado sólo en biopsias positivas por HIS-detección y, a la vista de los resultados obtenidos, se puede hablar de tres tipos de muestras:

1. Muestras negativas para las tres sondas:

La sensibilidad de la técnica de tipado es similar, en valores absolutos (copias de HPV/célula), a la de detección, ya que con ambas técnicas se obtiene un resultado positivo en las mismas líneas celulares, CaSki y HeLa, aunque con una clara diferencia de intensidad en la reacción positiva, debido al distinto número de copias de HPV en cada una de ellas³¹¹ (400-600 copias/célula en células CaSki y 20-50 copias/célula en células HeLa). Por ello, las muestras positivas por HIS-detección y negativas por HIS-tipado se interpretan como infecciones por tipos de HPV no cubiertos con las sondas utilizadas (al tabular los resultados estos tipos virales se han

denominado "otros").

2. Muestras positivas para una sonda:

Las sondas utilizadas no son específicas de tipos aislados de HPV, sino que están constituidas por cócteles de sondas específicas de los tipos virales más representativos de lo que clásicamente se han denominado grupos de bajo riesgo (sonda 6/11), alto riesgo (sonda 16/18) y riesgo intermedio (sonda 31/33/51) con respecto a la carcinogénesis. En consecuencia, las muestras que dan un resultado positivo con una sola sonda se interpretan como infecciones por tipos virales de un grupo de riesgo determinado, pero no se puede saber cuál es el tipo concreto que está presente en la muestra. Así, tanto las células CaSki como las células HeLa fueron positivas para la misma sonda (16/18) a pesar de que los genomas virales integrados en cada una de ellas corresponden a tipos distintos de HPV³¹¹ (HPV 16 en células CaSki y HPV 18 en células HeLa). Tampoco se puede saber si se trata de una infección por un único tipo viral o de una infección múltiple por dos virus del mismo grupo de riesgo o incluso si están presentes otros tipos virales no cubiertos con las sondas empleadas.

Desde un punto de vista semántico, estas biopsias se consideran positivas para los tipos virales que incluye la sonda correspondiente (biopsias positivas para los tipos 6/11 ó 16/18 ó 31/33/51 de HPV).

3. Muestras positivas para 2 ó 3 sondas:

En todas las biopsias en las que se obtuvo una reacción positiva para más de una sonda, éstas se observaron en zonas distintas del epitelio no superpuestas, lo que se interpreta como infecciones múltiples por dos o más tipos de HPV de distintos grupos de riesgo, como han demostrado recientemente Herrington y cols.³³⁷. Si la reacción positiva de cada sonda hubiese afectado a la misma zona de

epitelio, no podríamos saber si se trata de una infección múltiple o de una reacción cruzada. Dado que esto no se ha observado y que tampoco se obtuvieron reacciones cruzadas en las líneas celulares de control, indica que la técnica utilizada tiene una especificidad elevada.

V.4.2.1. Biopsias de vulva.

En piezas de vulva llama la atención que prácticamente en todos los condilomas acuminados positivos por HIS-detección (23 de 25) se detectó la presencia de los tipos 6/11 de HPV, coincidiendo con autores como Wilbur y cols.¹¹⁹, Schadendorf y cols.³¹⁶ y Bleiweiss y cols.³²³, que solo detectan estos tipos virales en los condilomas que estudian. Esto apoya el carácter benigno de este tipo de lesiones, que en muchas ocasiones regresan espontáneamente y en muy raras ocasiones progresan hacia una malignidad.

Kasher y Roman²⁰³ citan varios carcinomas epidermoides de vulva positivos para HPV 6 como casos muy raros en los que se detecta una duplicación de la región URR del genoma de este tipo viral. De los tres carcinomas estudiados por nosotros ninguno fue positivo para HPV 6/11, pero sí lo fueron un VIN I y un VIN II.

Aunque en la literatura revisada hemos encontrado varios trabajos en los que se describen infecciones múltiples en condilomas acuminados de vulva^{119,316,331}, ningún autor cita una infección por tres tipos virales de tres grupos de riesgo distintos. Nosotros encontramos una pieza positiva para las tres sondas correspondiente a una mujer de 24 años de edad, con múltiples parejas sexuales, que presentaba varios condilomas en vulva y región perianal. Las tres reacciones positivas no se observaron, sin embargo, en sendos condilomas, sino en zonas distintas de una misma pieza. Este condiloma podría haberse originado como respuesta a una infección inicial por un sólo tipo de HPV y posteriores infecciones sobreañadidas por los otros dos tipos virales, o bien por la confluencia de tres

lesiones muy próximas producidas cada una de ellas por un tipo viral distinto.

Por último, merece la pena mencionar el porcentaje relativamente elevado de positividad para los tipos 31/33/51 de HPV en comparación con lo publicado por otros autores^{119,316,323,331,338}.

V.4.2.2. Biopsias de cérvix uterino.

El primer punto a resaltar es la diferencia estadísticamente significativa en la distribución de tipos virales por lesiones ($p < 2 \times 10^{-5}$), reflejado perfectamente en la figura IV.15 y que justifica el agrupamiento de los distintos tipos de HPV en grupos de riesgo. Así, el porcentaje de detección de los tipos 6/11 de bajo riesgo es máximo en lesiones benignas (condilomas acuminados), disminuye en lesiones con potencialidad de evolución maligna a medida que aumenta el grado de la lesión y es nulo en carcinomas epidermoides. Con los tipos 16/18 de alto riesgo sucede lo contrario ya que no hemos obtenido ningún condiloma acuminado positivo para estos tipos de HPV y son los más frecuentes en HSIL. Los tipos 31/33/51 de riesgo intermedio se han detectado en todas las lesiones estudiadas sin una gran variación en sus respectivos porcentajes (33%-55%).

En la tabla V.II se comparan nuestros resultados con los obtenidos por otros autores en varios países, incluido España, con sondas que cubren los tres grupos de riesgo.

Lo más llamativo de esta tabla es que en nuestro estudio hemos observado en todas las lesiones un porcentaje de positividad para los tipos de riesgo intermedio superior al publicado por la mayoría de los autores en el extranjero, hasta el punto de que son los tipos más frecuentes en LSIL y carcinomas epidermoides, contrariamente a lo encontrado en la literatura internacional, en la que en estas lesiones predominan los tipos de alto riesgo. Únicamente Gitsch y cols.³³⁹, en Austria, obtienen unos resultados muy similares a los nuestros en CIN.

AUTOR ¹ Y PAIS	TIPOS VIRALES	LESION			
		Condiloma	LSIL ²	HSIL ³	Carcinoma
Pao ³¹⁴ (China)	6/11	63.2	20		12.5
	16/18	20.7	63.3		62.5
	31/33	16.1	16.7		25
Lorincz ²⁰⁷ (EEUU, Brasil y Perú)	6/11		11.8	20	---
	16/18		23.5	60	71.9
	31		17.6	13.3	6.2
Reid ³³⁸ (EEUU)	6/11	78.6	42.9	12.7	---
	16/18	7.1	28.6	60	80
	31	---	14.3	14.5	10
Nuovo ³³¹ (EEUU)	6/11		20	---	
	16/18		33	69	
	31/33/35		30	28	
Cooper ^{329, 330} (Sudáfrica)	6/11			---	---
	16/18			63.9	100
	31/33/35			36.1	---
Cooper ^{329, 330} (Inglaterra)	6/11			---	---
	16/18			84	80
	31/33/35			16	20
Gitsch ³³⁹ (Austria)	6/11		16.6		
	16/18		40.5		
	31/33		42.9		
Riera ³³⁵ (España)	6/11		20		
	16/18		50		
	31/35/51		60		
Ochotorena ³¹⁹ (España)	6/11	100	---	---	
	16/18	---	33.3	77.1	
	31/33/51	---	83.3	51.4	
Gómez (España)	6/11	70.8	27.7	10	---
	16/18	---	34	50	36.4
	31/33/51	33.3	44.7	40	54.5

¹ Primer autor del trabajo y país del que proceden las muestras estudiadas.

² LSIL/CIN I.

³ HSIL/CIN II - CIN III.

Tabla V.II. Comparación de los resultados porcentuales obtenidos por diversos autores en lesiones cervicales mediante HIS-tipado para HPV.

Es posible que estas diferencias de porcentajes sean debidas a que en la mayor parte de los trabajos revisados las sondas correspondientes al grupo de riesgo intermedio cubren menos tipos virales o algún tipo distinto que la empleada por nosotros. Sin embargo, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Riera y cols.³³⁵ en Asturias y por Ochotorena³¹⁹ en Murcia, por lo que otra posible explicación es una mayor incidencia de los tipos de HPV de riesgo intermedio en España, aunque con los datos que disponemos no podemos saber si predomina uno solo de los tipos incluidos en la sonda o son los tres los que son más habituales en nuestro medio geográfico.

Por lo que respecta a la infección múltiple, prácticamente en todos los trabajos consultados se mencionan casos de infección por 2 ó más tipos de HPV, pero los porcentajes varían mucho de unos autores a otros, ya que este parámetro está muy influenciado por la técnica utilizada y por las características epidemiológicas de la población estudiada. En nuestro trabajo se detectó infección múltiple en el 8.2% de las biopsias HPV-positivas, valor similar al obtenido por Bleiweiss y cols.³²³ (9%).

V.5. PARAMETROS MORFOLOGICOS ASOCIADOS A LA HIBRIDACION *IN SITU*.

V.5.1. PATRON DE MARCAJE.

Cooper y cols.³²⁹, en 1991, describieron por primera vez la existencia de tres tipos de reacción positiva por hibridación *in situ*, a los que denominaron tipo 1 ó difuso, tipo 2 ó puntual y tipo 3 ó mixto. Estos autores asumieron en un principio la hipótesis de que la señal de tipo 2 podía representar la integración del genoma de HPV en el de la célula infectada. Esta hipótesis se basaba en tres observaciones:

- En células CaSki y HeLa, con múltiples copias de HPV integradas, la señal que se obtiene por hibridación *in situ* es de tipo puntual.
- En todos los carcinomas epidermoides HPV-positivos que ellos estudiaron la señal obtenida era de tipo puntual.
- En figuras mitóticas de un carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado observaron señales puntuales apareadas, que interpretaron como reacciones positivas en cromátidas hermanas.

Para confirmar esta hipótesis, los mismos autores³⁴⁰ determinaron el estado físico del genoma de HPV mediante Southern blot y análisis de restricción en 11 biopsias cervicales: 7 CIN y 4 carcinomas epidermoides. En las biopsias en las que obtuvieron una señal tipo 1 por hibridación *in situ* demostraron la existencia de ADN episómico de HPV, en las que obtuvieron una señal de tipo 2 demostraron la existencia de ADN integrado de HPV y en las que obtuvieron una señal de tipo 3 demostraron la existencia de ADN episómico e integrado de HPV. En este trabajo Cooper y cols.³⁴⁰ concluyen que cada tipo de señal se corresponde con un estado físico del genoma de HPV.

Nosotros también hemos observado estos tres tipos de reacciones positivas por hibridación *in situ*, pero con algunas diferencias respecto de Cooper y cols. Concretamente, estos autores aplican la terminología "señal tipo 1, 2 ó 3" indistintamente a células individuales y tejidos. Nosotros distinguimos ambos niveles:

A nivel celular únicamente consideramos dos tipos de marcaje: uniforme (todo el núcleo muestra una reacción positiva homogénea) y puntual (la reacción positiva se observa en forma de puntos intranucleares). Las células que presentan un núcleo con una reacción positiva uniforme y 1 ó varios puntos más intensos se consideran con marcaje uniforme a diferencia de Cooper y cols. que las consideran señal tipo 3 ó mixta.

A nivel de tejido, y según el tipo de células positivas predominante, sí consideramos tres tipos distintos de lo que hemos denominado "patrón de marcaje": patrón uniforme, que equivale a la señal tipo 1 de Cooper y cols.³²⁹; patrón puntual, que equivale a la señal tipo 2 de Cooper y cols.³²⁹; patrón mixto, que equivale parcialmente a la señal tipo 3 de Cooper y cols.³²⁹, ya que sólo se considera este tipo de patrón de marcaje cuando en la biopsia se observan unas células con marcaje uniforme y otras con marcaje puntual en proporciones similares. Cuando predominan células en las que se combinan ambos tipos de marcaje hemos considerado un patrón de marcaje uniforme, a diferencia de Cooper y cols.³²⁹ que lo consideran también señal tipo 3.

La explicación que nosotros sugerimos para la existencia de estos tres patrones de marcaje no coincide con la hipótesis de Cooper y cols.³⁴⁰. En nuestra opinión, el tipo de marcaje está relacionado con el número de copias del genoma de HPV/célula, independientemente de su estado físico. Así, el marcaje uniforme reflejaría un número elevado de copias de HPV y el puntual un número reducido de copias que, probablemente, en muchas ocasiones coincida con genoma de HPV episómico o integrado, respectivamente (pero no siempre, como suponen Cooper y cols.³⁴⁰).

Esta hipótesis permite explicar algunos casos que tendrían difícil explicación con la propuesta por Cooper y cols.³⁴⁰ Concretamente, en algunas piezas se observa un marcaje puntual muy débil en células basales y parabasales, un marcaje uniforme de poca intensidad en células del tercio medio del epitelio y un marcaje uniforme muy intenso en células superficiales. Según la hipótesis de Cooper y cols.³⁴⁰ esto reflejaría integración del genoma viral en las células basales y parabasales y mantenimiento de la forma episómica en células de los tercios superior y medio del epitelio. Sin embargo, parece más lógico suponer que, de acuerdo con la biología viral, el número de copias del genoma de HPV en células basales (la infección se inicia en estas células) y parabasales (a este nivel se transcriben los genes reguladores de HPV y se inicia la replicación de su ADN) es bajo y aumenta progresivamente a medida que se produce la maduración celular, siendo máximo en las células de capas superficiales, en las que se

efectúa el ensamblaje de los nuevos viriones. En nuestro estudio, todas las biopsias en las que se observó esta gradación se contabilizaron como patrón de marcaje uniforme, puesto que el número de células con este tipo de marcaje era, globalmente, muy superior al de células con marcaje puntual.

Un caso distinto es el de biopsias con patrón de marcaje mixto en las que en las mismas capas celulares del tercio superior del epitelio se observan unas células con marcaje uniforme y otras con marcaje puntual. Según nuestra hipótesis, el comportamiento del virus en esas lesiones variaría de unas células a otras: mientras que en unas, probablemente, se llevaría a cabo el ciclo viral completo (marcaje uniforme), en otras este ciclo viral se habría interrumpido, posiblemente por integración del genoma vírico en el de la célula infectada, por lo que el número de copias de HPV se mantendría bajo (marcaje puntual). En este caso nuestra hipótesis coincidiría con la de Cooper y cols.³⁴⁰

En las células con ambos tipos de marcaje simultáneo, según Cooper y cols.^{329,330,340} coexisten ambos estados físicos del genoma de HPV. En nuestra opinión esto no tiene por qué ser necesariamente así. De hecho, con microscopía electrónica se observan, en células infectadas por HPV, acúmulos de partículas víricas intranucleares formando pseudocristales, además de partículas víricas aisladas. En estas células, en las que se está produciendo el ensamblaje de nuevos virus, es muy probable que haya un gran número de copias episómicas del genoma de HPV, lo que determinaría un marcaje uniforme por hibridación *in situ*, a la vez que esos acúmulos de partículas víricas podrían originar señales puntuales de gran intensidad. Dado que, en cualquier caso, el número de copias de HPV probablemente es elevado, nosotros consideramos estas células con marcaje uniforme, como ya se ha mencionado antes.

Lo que sí parece claro es que los tres patrones de marcaje reflejan distintas situaciones de la infección por HPV y no son consecuencia de factores ajenos a la biología viral, como son variaciones en la manipulación y procesamiento de las muestras o en la realización de la técnica. En este sentido, en la literatura revisada únicamente hemos encontrado dos grupos que hagan

referencia a tipos de marcaje, y ambos emplean técnicas de hibridación *in situ* diferentes entre sí y distintas de la empleada por nosotros: Cooper y cols.^{329,330,340}, ya citados, que usan sondas marcadas con digoxigenina y detección del marcaje en tres pasos y, muy recientemente, Pöllänen y cols.³⁴¹, que asumen la terminología de Cooper y que emplean un equipo comercial basado en sondas biotiniladas distinto del nuestro.

En definitiva, creemos que la observación del patrón de marcaje aporta una valiosa información en el estudio de la infección por HPV, bien respecto al número de copias de HPV/célula, bien respecto al estado físico de éstas (y, probablemente, respecto de ambas en muchas ocasiones). Cooper y cols.³⁴⁰ apuntan que las lesiones con señal puntual pueden evolucionar peor, pero no han realizado ningún estudio estadístico al respecto, ni han relacionado tipos virales con tipos de marcaje. Nosotros pensamos que lesiones de igual grado, con patrones de marcaje diferente pueden evolucionar de distinta forma, razón por la que hemos efectuado un estudio con fines pronósticos.

V.5.1.1. Biopsias de vulva.

Los resultados obtenidos en vulva apuntan hacia una distribución asimétrica de los patrones de marcaje en las distintas lesiones. Mientras que en la mayoría de los condilomas acuminados (20 de 22) se observó un patrón uniforme, en los tres carcinomas epidermoides se observó un patrón puntual.

Por lo que respecta a la relación de los patrones de marcaje con los tipos virales detectados, todas las biopsias en las que se observó un patrón puntual fueron positivas para los tipos 31/33/51 de HPV o para tipos no cubiertos con las sondas utilizadas. En contraposición, en todos los casos, excepto uno, en que se demostró la existencia de los tipos 6/11 de HPV el patrón observado fue uniforme.

V.5.1.2. Biopsias de cérvix uterino.

Al estudiar la distribución de patrones de marcaje en los distintos tipos de lesión (fig. IV.20) se observa una clara tendencia hacia un mayor porcentaje del patrón puntual a medida que aumenta el grado de la lesión, siendo mínimo en condilomas acuminados y máximo en carcinomas epidermoides. Sin embargo, estadísticamente no hay una diferencia significativa, posiblemente por el pequeño número de carcinomas estudiado.

En donde sí se demuestra una diferencia estadísticamente significativa es en la relación entre patrón de marcaje y tipo viral (fig. IV.21), con una clara asociación entre los tipos de bajo riesgo y el patrón uniforme por un lado, y los tipos de riesgo intermedio y alto (sobre todo los primeros) y el patrón puntual. Hay que destacar, en este sentido, que no hemos encontrado ninguna biopsia positiva para los tipos 6/11 de HPV con un patrón puntual.

Todo esto nos induce a pensar que las lesiones en las que se detecta un marcaje puntual por hibridación *in situ* pueden tener peor pronóstico que aquellas lesiones de igual grado y producidas por el mismo tipo viral pero que presentan un marcaje uniforme. Una posible justificación de esta idea se basaría en la hipótesis formulada antes de que el patrón puntual refleja un bajo número de copias de HPV/célula, con lo que ello implica de no realización del ciclo viral completo y posible integración en el genoma de la célula infectada. Esta teoría se apoyaría también en la relación observada entre patrones de marcaje y resultados de la técnica de inmunohistoquímica (tabla IV.XVII), puesto que prácticamente todas las biopsias con patrón puntual (47 de 49) fueron negativas por inmunohistoquímica y, por lo tanto, corresponden a infecciones no productivas.

Hay un resultado que merece una mayor explicación para validar esta teoría: la observación de 7 condilomas acuminados con marcaje puntual (30.4% del total de condilomas). Los condilomas acuminados son lesiones benignas que muy raramente evolucionan hacia lesiones de más alto grado y malignidades y,

por supuesto, el porcentaje de progresión es muy inferior al 30%. Según la hipótesis de Cooper y cols.³⁴⁰ el genoma viral se encontraría de forma integrada en estas biopsias y, sin embargo, no progresarían. Esto invalidaría el patrón de marcaje como factor pronóstico.

Según nuestra hipótesis es posible otra explicación. Todos los condilomas con patrón puntual fueron positivos para los tipos 31/33/51 de HPV. Estos tipos de riesgo intermedio se caracterizan, según Lorincz y cols.²⁰⁷, porque las lesiones que producen evolucionan muy lentamente. Este hecho puede ser el reflejo de una tasa de replicación muy baja, que determinaría un número bajo de copias de su genoma, incluso en infecciones productivas. De hecho, uno de esos 7 condilomas acuminados fue positivo por inmunohistoquímica. Es posible, por tanto, que para estos tipos virales el patrón de marcaje tenga diferente significación en lesiones benignas y lesiones premalignas y malignas. De todas formas, si tenemos en cuenta que los tipos 31/33/51 son los más frecuentes en carcinomas epidermoides en nuestra casuística, seguimos manteniendo que el patrón de marcaje puede ser un buen factor pronóstico sobre la evolución de una lesión.

V.5.1.3. Resultados globales.

Dado que tanto en vulva como en cérvix uterino se ha observado la misma tendencia, se han considerado los resultados conjuntos para intentar obtener mayor información. Una vez comprobado que hay diferencia estadística significativa en la distribución de los tres patrones de marcaje en cada tipo de lesión ($p < 0.003$), los datos se agruparon para poder estudiar tablas de contingencia de 2x2, considerando las lesiones por parejas (tablas IV.XVIII y IV.XIX).

En primer lugar se estudió la relación entre el patrón de marcaje puntual y el grado histológico de la lesión. Se utilizó la razón de ventaja como medida de la

asociación entre ambos parámetros. Los valores obtenidos demuestran una elevada asociación entre el patrón puntual y el carcinoma epidermoide, lo que sugiere que este parámetro puede ser considerado como un factor de riesgo en la evolución de una lesión hacia una malignidad, en el sentido de que una biopsia diagnosticada de SIL en la que se observe un patrón de marcaje puntual por hibridación *in situ* tiene una probabilidad mayor de evolucionar a carcinoma epidermoide que otra lesión de igual grado histológico en la que se observe un patrón de marcaje uniforme o mixto. Una medida indirecta de esta probabilidad es el riesgo relativo, que en este caso es suficientemente elevado (3.82) como para considerar el patrón de marcaje como un factor pronóstico.

En segundo lugar, se repitió este estudio considerando conjuntamente los patrones puntual y mixto, ya que en las biopsias en las que se detecta este último hay una población celular importante que contiene, presumiblemente, un número bajo de copias de HPV y, por lo tanto, pueden evolucionar de forma similar a una lesión con patrón puntual. En efecto, se demuestra una fuerte asociación entre ambos patrones y el carcinoma epidermoide (razón de ventaja de riesgo 10.69 cuando se comparan carcinomas y SIL) y el riesgo relativo de evolución de SIL a carcinoma es también mucho mayor (8.52).

En nuestra opinión, las SIL HPV-positivas por hibridación *in situ* con un patrón de marcaje puntual o mixto tienen, por tanto, peor pronóstico que aquéllas en las que se observa un patrón uniforme o, dicho de otra manera, tienen mayor riesgo o probabilidad de evolucionar a carcinoma epidermoide.

V.5.2. PATRON DE DISTRIBUCION DE LAS CELULAS POSITIVAS.

En 1988 Wilbur y cols.¹¹⁹ mencionan que el número y distribución de células positivas por hibridación *in situ* varía mucho de unas lesiones a otras, desde una sola célula positiva hasta prácticamente el 100% de las células, aunque la mayor parte de las biopsias mostraban varios grupos de 10-20 células positivas.

Nosotros también hemos observado esta característica morfológica de la hibridación *in situ*, a la que hemos llamado "patrón de distribución" y hemos considerado dos patrones diferentes: multifocal y aislado. La explicación de los mismos con respecto a la biología viral no está muy clara. Wilbur y cols.¹¹⁹ consideran que es el reflejo de una microheterogeneidad de expresión de HPV, pero no explican la causa de la misma.

Parece claro que, a diferencia del patrón de marcaje, no existe una relación directa entre número de copias de HPV/célula y patrón de distribución, ya que, por un lado, hemos observado dos carcinomas con un patrón de distribución multifocal en los que todas las células positivas presentaban un único punto intranuclear (patrón de marcaje puntual), por lo que se presupone un número muy bajo de copias/célula; por otro lado, en varias biopsias con diversos diagnósticos se combinan un patrón de distribución aislado con un patrón de marcaje uniforme.

Sí parece existir cierta relación entre patrón de distribución aislado e infección no productiva, puesto que la mayor parte de las biopsias con este patrón (68 de 73) fueron negativas por inmunohistoquímica. Sin embargo, la relación contraria entre patrón multifocal e infección productiva no se observa, ya que el porcentaje de biopsias con este patrón positivas y negativas por inmunohistoquímica es similar (55.3% y 44.7%, respectivamente).

Una posible explicación se basa en el propio mecanismo de infección. Actualmente se asume que la infección por HPV se inicia en las células de la capa basal y que el virus alcanzaría esta capa a través de alteraciones o microlesiones del epitelio⁹⁶. Estas células son permisivas pero en ellas no se puede llevar a cabo la síntesis de nuevos viriones, pues para ello se necesita un microambiente celular que únicamente se da en células epiteliales maduras (queratinocitos). Una vez que el ADN vírico alcanza el núcleo de la célula infectada, comienza la síntesis de proteínas reguladoras y la replicación vírica, de forma que todas las células epiteliales que se deriven de ella estarán infectadas. Si se producen infecciones simultáneas de varias células basales próximas, a partir de ellas se originarán grupos o clones de células infectadas, que puede

traducirse en un patrón de distribución multifocal o parcheado al realizar una técnica de hibridación *in situ*. Puede ocurrir también que una célula basal infectada entre en mitosis antes de que comience la replicación del ADN viral, de manera que el material genético vírico se incorpore exclusivamente en una célula que haya perdido la capacidad de dividirse. Esto daría lugar a un patrón de distribución aislado. Otra posibilidad es que la infección inicial afecte también a células parabasales inmaduras, todavía permisivas, pero sin capacidad de división, lo que igualmente daría lugar a un patrón de distribución aislado.

Es muy posible que el patrón de distribución no tenga una única explicación sino que sea el reflejo de un cúmulo de factores. Es probable que la respuesta inmune local juegue un papel muy importante. En algunas biopsias se observan infiltrados linfocitarios locales que en muchas ocasiones coinciden con zonas negativas por hibridación *in situ* o positivas con un patrón aislado, hecho que también han descrito Ochotorena³¹⁹ y Toki y Yajima³⁴².

V.5.2.1. Biopsias de vulva.

Al igual que ocurría con el patrón de marcaje, los resultados obtenidos en vulva apuntan hacia una distribución asimétrica de este parámetro, puesto que en condilomas acuminados predomina el patrón multifocal, mientras que en todos los carcinomas se observó un patrón aislado.

V.5.2.2. Biopsias de cérvix uterino.

Los resultados obtenidos en piezas de cérvix confirman la tendencia observada en vulva. Mientras que en condilomas acuminados predomina el patrón multifocal, en SIL y carcinomas predomina el patrón aislado. Esta dualidad, que se observa claramente en la figura IV.29 se traduce en una diferencia estadísticamente significativa entre condiloma y SIL. Por el contrario, no hay

diferencia significativa entre SIL y carcinomas.

Al estudiar conjuntamente los resultados de vulva y cérvix se obtiene una diferencia significativa ($p < 0.005$) cuando se consideran los resultados globalmente, lo que indica que hay una relación entre el patrón de distribución y el tipo de lesión. Sin embargo, este dato únicamente refleja la dualidad ya señalada, puesto que cuando se estudian las lesiones por parejas hay diferencia significativa entre condilomas y SIL ($p < 0.003$) pero no la hay entre SIL y carcinomas.

Para que un parámetro se pueda considerar un buen factor pronóstico tiene que cumplir dos requisitos: su distribución en las distintas lesiones debe reflejar, globalmente, una diferencia significativa estadísticamente y ello se debe traducir en diferencias igualmente significativas cuando se consideran las lesiones por parejas. Esto permite cuantificar de alguna manera el riesgo de que una lesión intraepitelial evolucione hacia carcinoma.

En el caso del patrón de distribución se cumple sólo uno de los dos requisitos, por lo que no parece ser un buen factor pronóstico, al menos cuando se considera de forma aislada.

Cuando se estudia la relación entre patrón de distribución y los tipos virales detectados se observa una dualidad similar: hay una clara asociación entre el patrón multifocal y los tipos de bajo riesgo y entre el patrón aislado y los tipos de riesgo intermedio y alto, que estadísticamente se traduce en diferencias significativas entre los tipos 6/11 y 16/18 ó 31/33/51 de HPV. No hay, en cambio, diferencias entre los tipos 16/18 y 31/33/51.

V.5.3. POSICION RELATIVA DE LAS CELULAS POSITIVAS EN EL GROSOR DEL EPITELIO.

Al describir los resultados obtenidos con hibridación *in situ* numerosos autores señalan que la reacción positiva puede afectar a células de todas las capas del epitelio, aunque lo más frecuente es que afecte sólo a células del tercio superior.

Nosotros también hemos observado este fenómeno y hemos agrupado las muestras en tres categorías según el tercio de epitelio (superior, medio o inferior) en el que se encontraron células positivas más próximas a la capa basal. Como en el caso del patrón de marcaje, es posible que esta característica morfológica de la hibridación *in situ* esté relacionada con el número de copias de HPV/célula, que se espera sea bajo en las células del tercio inferior del epitelio y elevado en las del tercio superior. En la literatura revisada no hemos encontrado ningún trabajo en el que se relacione este parámetro con la evolución de las lesiones.

V.5.3.1. Biopsias de vulva.

Los resultados obtenidos en vulva muestran una clara asociación entre la presencia de células positivas en el tercio medio del epitelio y condilomas acuminados, por un lado, y los tipos 6/11 de HPV, por otro lado.

V.5.3.2. Biopsias de cérvix uterino.

En la mayor parte de las biopsias HPV-positivas se observaron células marcadas en los tercios superior y medio del epitelio, independientemente de la lesión diagnosticada y del tipo viral detectado. Esto se traduce en que las diferencias encontradas entre las lesiones consideradas o entre los tres grupos virales de riesgo no son estadísticamente significativas. En consecuencia, no se

puede considerar esta característica como factor pronóstico.

V.5.4. RELACION ENTRE EL PATRON DE MARCAJE Y EL PATRON DE DISTRIBUCION.

Como hemos comentado anteriormente, el patrón de distribución no puede ser utilizado de forma aislada como factor pronóstico, pues aunque hay una gran diferencia entre los resultados obtenidos en lesiones benignas y SIL, la diferencia entre SIL y carcinomas no es significativa. Sin embargo, ante la posibilidad ya planteada de que este parámetro esté relacionado con el mecanismo de infección o la respuesta inmune local, hemos estudiado conjuntamente el patrón de marcaje y el patrón de distribución para ver si de esta manera se consigue mayor significación estadística.

En efecto, tras agrupar los datos de vulva y cérvix en tablas de contingencia de 2x2 se observa una asociación entre la combinación patrón de marcaje puntual/patrón de distribución aislado y el carcinoma epidermoide (razón de ventaja 4.11 cuando se la compara con SIL). Esto se traduce en un riesgo relativo de evolución de SIL a carcinoma de 3.35 para aquellas piezas en las que se observen ambos patrones.

En consecuencia, el patrón de marcaje, tanto de forma aislada, como asociado con el patrón de distribución es un buen indicador del riesgo de evolución de una lesión.

Por lo que respecta a la relación de estos dos patrones con los tipos virales hay que destacar por un lado la asociación de la combinación uniforme/multifocal con los tipos 6/11 de HPV y por otro lado la asociación de la combinación puntual/aislado con los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV.

Una vez más, hay diferencia significativa entre los tipos de bajo riesgo y

riesgo intermedio o alto, pero no la hay entre los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV.

V.6. ESTUDIOS COMPARATIVOS.

Una parte importante del presente trabajo consiste en la realización de estudios comparativos, tanto entre las técnicas utilizadas como entre muestras con distintas características histopatológicas o distintas procedencias. Para ello se han considerado sólo las biopsias con más de 5 mm de epitelio, a fin de que las conclusiones obtenidas tengan la mayor validez posible.

V.6.1. COMPARACION ENTRE INMUNOHISTOQUIMICA E HIBRIDACION *IN SITU*.

Antes de comparar ambas técnicas conviene analizar brevemente los resultados obtenidos con cada una de ellas por separado, ya que estamos manejando datos correspondientes a la situación ideal (longitud de epitelio superior a 5 mm).

Con respecto a la inmunohistoquímica se observa un aumento de la sensibilidad en condilomas acuminados, que pasa del 58.1% en vulva y 53.8% en cérvix uterino cuando se consideran todas las biopsias al 62.1% y 60.9%, respectivamente, al considerar sólo biopsias con más de 5 mm de epitelio. Esta sensibilidad está muy próxima a la obtenida por Schadendorf y cols.³¹⁶ (69%) y es igual a la obtenida por Jou y cols.³¹⁸ en España (60%) en condilomas acuminados de cérvix.

Por lo que respecta a la hibridación *in situ*, en cérvix uterino se observa un sensible aumento en el porcentaje de positividad en LSIL, que pasa del 52.2% en el total de biopsias al 68.4% en piezas con más de 5 mm de epitelio, y HSIL, que pasa del 76.9% al 86.8%. Estos resultados son comparables a los obtenidos

por otros autores con técnicas en teoría más sensibles. Así, Lorincz y cols.²⁰⁷, con Southern blot, obtienen unos resultados prácticamente iguales a los nuestros en CIN I (70.8%) y CIN II + CIN III (88.2%) y ligeramente inferiores en carcinomas escamosos (82.1%). Riou y cols.³⁴³, con Southern blot y PCR, obtienen un 83.1% de carcinomas escamosos positivos, porcentaje que asciende al 87.7% cuando consideran sólo muestras procedentes de Argel, pero que en cualquier caso es inferior a nuestro resultado. Iwasaka y cols.³⁴⁴, también con una combinación de Southern blot y PCR, obtienen un 94.7% de positividad en carcinomas cervicales, ligeramente superior a nuestro 91.7%.

Esto constituye una prueba más a favor de la importancia que tiene el tamaño de una biopsia, y más concretamente la longitud de epitelio presente en la misma, para que los resultados de la hibridación *in situ* sean lo más fiables posible y comparables con la técnica de referencia.

Al discutir los resultados de la hibridación *in situ* en el total de biopsias se comentó que la sensibilidad calculada para la técnica en condilomas acuminados de cérvix (92.3%) todavía no podía extrapolarse a otras lesiones. Pues bien, ahora sí estamos en condiciones de poder hacerlo. Al aplicar un test estadístico a los resultados obtenidos en las distintas lesiones se obtiene que existe una diferencia significativa ($p < 0.02$). Si nos fijamos en la figura IV.41 se aprecia que esta diferencia se debe al peor resultado obtenido en LSIL (68.4%) en comparación con el resto de lesiones. De hecho, si repetimos el test estadístico considerando conjuntamente LSIL y HSIL o sin considerar las LSIL, las diferencias en los porcentajes de positividad en cada lesión no son significativas. Esto nos permite suponer que la sensibilidad de la hibridación *in situ* en HSIL y carcinomas es muy parecida a la calculada en condilomas acuminados (95.6% en biopsias con más de 5 mm de epitelio) y la podemos situar alrededor del 90%.

Ahora bien, ¿por qué los resultados de la hibridación *in situ* en LSIL no están en concordancia con los del resto de lesiones? No es probable que este resultado sea debido al azar, ya que la diferencia con las otras lesiones es significativa estadísticamente. Además, este fenómeno también ha sido observado

por otros autores, aunque ninguno de ellos lo explica: Faulkner-Jones y cols.³²⁸ obtienen un 33.3% de positividad en CIN I y un 76.9% en CIN II + CIN III; Pao y cols.³¹⁴, 50% en CIN I y 76.9% en CIN II + CIN III; Meyer y cols.³³², 29% en CIN I y 69% en CIN II + CIN III; y Ochotorena³¹⁹, 12% en CIN I y 37.2% en CIN II + CIN III.

Una posible explicación es que parte de las lesiones diagnosticadas de LSIL pueden representar lesiones de grado superior (HSIL) en período de regresión. Nasiell y cols.²¹¹, en un estudio de seguimiento a largo plazo de 894 pacientes con displasia moderada, observaron regresión en el 54% de los casos. La regresión de una lesión depende en gran medida de una buena respuesta inmune, en este caso a nivel local, que muy probablemente negativizaría la detección de HPV por hibridación *in situ*. Esta teoría se ve apoyada indirectamente por los resultados de varios autores: Toki y Yajima³⁴² encontraron en lesiones cervicales una asociación estadísticamente significativa entre ausencia de inmunorreactividad y la presencia de un intenso infiltrado inflamatorio y Ochotorena³¹⁹ encontró una asociación significativa entre la presencia de infiltrado inflamatorio intenso y CIN I, lesiones en las que obtuvo el porcentaje más bajo de positividad por hibridación *in situ* (12%). Nosotros también hemos observado un infiltrado linfocitario en algunas LSIL HPV-negativas, pero no en todas.

Otra explicación es que parte de las lesiones diagnosticadas de LSIL no son producidas por HPV, pero este punto lo trataremos un poco más adelante al comentar los resultados obtenidos en biopsias compatibles y no compatibles con infección por HPV.

Al comparar ambas técnicas se observa que el número de muestras positivas por inmunohistoquímica es siempre menor que por hibridación *in situ*, tanto en vulva como en cérvix (diferencias estadísticamente significativas). El valor más elevado de sensibilidad de la inmunohistoquímica frente a la hibridación *in situ* se obtiene en condilomas acuminados de vulva (72%). En cérvix, el valor más elevado se obtiene también en condilomas acuminados (63.6%) y disminuye

de manera importante en LSIL (25.6%) y HSIL (12.1%), siendo nulo en carcinomas.

Esta gran diferencia de sensibilidad entre ambas técnicas, sobre todo en lesiones de alto grado, junto con la mayor información aportada por la hibridación *in situ* en cuanto al tipo de virus presente en una lesión, ha determinado que en muchos laboratorios de anatomía patológica se abandone la técnica de inmunohistoquímica en el diagnóstico de esta infección. Es evidente que el diagnóstico, como tal, no puede hacerse con esta técnica, pero nosotros consideramos que debería utilizarse como técnica complementaria, ya que aporta una información muy útil que no puede obtenerse mediante hibridación *in situ*: la naturaleza productiva o no productiva de una infección por HPV. Este dato puede constituir otro importante factor pronóstico, pues, como se comprueba en la tabla IV.XXIX, las diferencias en los resultados obtenidos por lesiones son estadísticamente significativas y al estudiarlas por parejas se obtiene una fuerte asociación entre resultado positivo por inmunohistoquímica y lesiones benignas y viceversa, resultado negativo por inmunohistoquímica y lesiones con potencialidad de evolución maligna (razón de ventaja de riesgo 7.25). El hecho de que no se obtenga una diferencia significativa entre SIL y carcinomas es debido probablemente al bajo número de carcinomas estudiado y ello nos impide dar una medida estadística del riesgo o probabilidad de que una SIL IHQ-negativa evolucione hacia carcinoma. Sin embargo, dada la tendencia tan clara observada en el sentido de disminución de inmunorreactividad con el grado histológico de la lesión, creemos que el resultado inmunohistoquímico debe ser considerado un importante factor pronóstico.

Al comparar la inmunohistoquímica con HIS-tipado se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 10^{-6}$) en la sensibilidad de la inmunohistoquímica respecto de los distintos tipos virales. Hay una clara asociación entre tipos 6/11 de HPV y resultado positivo por inmunohistoquímica y entre tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV y resultado negativo. Esta es una prueba más de que los tipos de riesgo intermedio y alto producen con mayor frecuencia infecciones no productivas. De nuevo no hay diferencias significativas entre los

tipos 16/18 y 31/33/51.

Es posible que una parte de las lesiones IHQ-negativas, sobre todo los condilomas acuminados, represente lesiones en regresión a consecuencia de una respuesta inmune adecuada.

Esta claro que una paciente con una lesión HPV-positiva por hibridación *in situ* debe considerarse potencialmente infectante, pero si la técnica de inmunohistoquímica es también positiva debe considerarse como altamente infectante y tomar las medias oportunas para evitar el contagio de sus parejas sexuales.

V.6.2. COMPARACION ENTRE BIOPSIAS COMPATIBLES Y NO COMPATIBLES HISTOPATOLOGICAMENTE CON INFECCION POR HPV.

A la vista de los datos de las tablas IV.XXX y IV.XXXI lo primero que hay que señalar es que los criterios histopatológicos de compatibilidad con infección por HPV son muy poco específicos, puesto que en vulva todas las lesiones no compatibles con infección por HPV son positivas por hibridación *in situ* y en cérvix no hay diferencia significativa estadísticamente entre los resultados de esta técnica en ambos tipos de lesión.

Si analizamos un poco más detenidamente ambas tablas comprobamos que tan sólo un carcinoma de vulva fue positivo por inmunohistoquímica (y como ya se ha mencionado en una localización ajena al tejido neoplásico); el resto de lesiones no compatibles con infección por HPV en ambas localizaciones anatómicas fue IHQ-negativo. Esto parece indicar que los criterios de compatibilidad con infección por HPV son el reflejo de alteraciones celulares, relacionadas con la interacción virus-célula, características de infecciones productivas. Ahora bien, si esto es cierto ¿cómo se explica el reducido número

de LSIL y HSIL compatibles con infección por HPV y positivas por inmunohistoquímica? Según Monsonégo¹⁰⁰, el proceso de carcinogénesis inducida por HPV puede seguir dos vías diferentes: una vía rápida, muy rara, en la que la integración del genoma de HPV se produciría al poco tiempo de la infección y daría lugar al desarrollo rápido de carcinomas epidermoides, sin pasar prácticamente por estadios preneoplásicos (SIL); y otra vía lenta, la más habitual, en la que la integración del genoma de HPV se produciría de una manera progresiva debido a la acción de ciertos cofactores (tabaco, carencia de beta-caroteno, inmunodepresión, etc.) y en la que la aparición de un carcinoma viene precedida de SIL de bajo y alto grado. Esta vía lenta puede desarrollarse a partir de infecciones productivas.

Según esta teoría, las lesiones intraepiteliales compatibles con infección por HPV e IHQ-positivas serían la consecuencia de infecciones productivas benignas; las SIL compatibles con infección por HPV e IHQ-negativas representarían, bien lesiones en regresión por una buena respuesta inmune, bien lesiones productivas en las que se ha iniciado el proceso de integración y han perdido ya la inmunorreactividad, bien lesiones no productivas en las que a consecuencia de la lentitud del proceso de integración, el ciclo viral se ha desarrollado lo suficiente como para que se produzcan las alteraciones celulares típicas de compatibilidad con infección. Las SIL no compatibles con infección por HPV representarían mayoritariamente integración del genoma de HPV.

Nuestros resultados apoyan esta hipótesis, ya que en lesiones no compatibles con infección únicamente se han detectado virus de riesgo intermedio y alto y además se observa una clara asociación de estas lesiones con el patrón de marcaje puntual por hibridación *in situ* (diferencia estadísticamente significativa con lesiones compatibles con infección, $p < 0.04$). En este punto conviene señalar que la proporción en que se han detectado los tipos 31/33/51 de HPV en lesiones no compatibles es el doble de la de los tipos 16/18. Esto puede ser consecuencia de la baja tasa de replicación de los tipos de riesgo intermedio, ya mencionada con anterioridad, que daría lugar a lesiones histopatológicamente no compatibles, incluso sin integración del genoma vírico.

Por todo ello, creemos que la hibridación *in situ* se debe realizar en todas las biopsias diagnosticadas de SIL, independientemente de que sean compatibles o no con infección por HPV y sugerimos que las SIL no compatibles con infección e HIS-positivas tendrían peor pronóstico que aquellas compatibles con infección.

Otro aspecto interesante de la tabla IV.XXXI es que aunque consideremos sólo las lesiones compatibles con infección por HPV, el porcentaje de positividad por hibridación *in situ* en LSIL es sensiblemente inferior al del resto de lesiones, lo que parece indicar que un porcentaje de LSIL histopatológicamente compatible con infección por HPV tiene una etiología distinta. Esto es hasta cierto punto lógico, ya que la categoría LSIL engloba lesiones en las que la atipia citológica (anisonucleosis, hiperchromatismo) no es muy grande y se observa exclusivamente en el tercio superior del epitelio. Estas alteraciones son producidas no sólo por HPV, sino también por múltiples agentes etiológicos y de ahí que se separen las lesiones compatibles de las que no lo son. Por otra parte, las características hitopatológicas de compatibilidad con infección por HPV^{118,179} (coilocitosis, binucleación o multinucleación, disqueratosis, papilomatosis, contorno nuclear irregular) se encuentran también por separado en otras patologías, algunas de ellas infecciosas¹¹⁷. De hecho un porcentaje importante de pacientes en las que se diagnostican este tipo de lesiones refiere historias de cervicitis de repetición e infecciones por diversos gérmenes. Recientemente Cancelo⁶⁸ encontró que el 69.6% de una población con alteraciones colposcópicas y/o histológicas compatibles con infección por HPV presentaban infección por uno o dos gérmenes. Es posible, pues, que parte de las LSIL compatibles con infección por HPV sean realmente originadas por otros agentes etiológicos. El porcentaje de progresión de estas lesiones sería muy pequeño en comparación con las lesiones producidas por HPV, lo que explicaría el mayor porcentaje de positividad para HPV en HSIL.

V.6.3. COMPARACION ENTRE MUESTRAS DE ARCHIVO Y MUESTRAS DE NUEVA OBTENCION.

Al revisar la literatura se encuentran estudios retrospectivos en los que la hibridación *in situ* se realiza sobre muestras incluidas en parafina con varios años de antigüedad³²⁸⁻³³¹. Todos los autores coinciden en que esta técnica es perfectamente válida para este tipo de estudios, pero los resultados que obtienen varían mucho de un trabajo a otro (ver tabla V.I). Probablemente estas diferencias son debidas a variaciones en las sondas y su marcaje, técnicas de detección, procedencia geográfica de las muestras, características epidemiológicas de las poblaciones estudiadas, etc.

No hemos encontrado, sin embargo, ningún trabajo en el que se comparen los resultados obtenidos en muestras de archivo y de nueva obtención. Nosotros pensamos que la validación de todos los resultados obtenidos en este trabajo y, por lo tanto, de todas las conclusiones, pasa por la confirmación de que realmente no hay diferencia entre un tipo de muestras y otro a la hora de realizar técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*.

El estudio comparativo realizado demuestra que estadísticamente no hay diferencia entre los resultados de ambas técnicas en los dos tipos de muestras, tanto cuando se consideran los totales como cuando se considera cada lesión por separado.

Esto indica que en tejidos fijados en formol tamponado e incluidos en parafina se conserva perfectamente la antigenicidad para HPV y el ADN vírico no experimenta ningún proceso de degradación (por lo menos durante los años revisados en este estudio). Se puede concluir, pues, que los estudios retrospectivos sobre la infección genital por HPV en este tipo de material son perfectamente válidos.

V.6.4. PROCEDENCIA GEOGRAFICA.

Como ya se ha mencionado, hemos obtenido un porcentaje de lesiones positivas para los tipos 31/33/51 de HPV superior al publicado por otros autores^{207,314,329-331,338} en poblaciones procedentes de diversos países. Para descartar que esto sea debido a una mayor prevalencia de estos tipos en alguna de las procedencias geográficas de que hemos obtenido las muestras, se realizó un estudio comparativo entre los resultados obtenidos en cada una de ellas.

No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa en la distribución de los distintos tipos virales por procedencias. En todas ellas el mayor porcentaje correspondió a los tipos 31/33/51, excepto en las muestras procedentes de los Centros de Salud del Ayuntamiento de Madrid, aunque este resultado no es significativo por el reducido número de las mismas.

La concordancia de nuestros resultados con los obtenidos por Riera y cols.³³⁵ en Asturias y por Ochotorena³¹⁹ en Murcia justifican la idea de que en España, o al menos en algunas comunidades autónomas, la tasa de incidencia de los tipos de riesgo intermedio es superior a la encontrada en otros países.

V.7. TECNICA DE DOBLE MARCAJE.

La detección simultánea de antígenos víricos y secuencias génicas específicas de HPV puede ser de gran interés para comprender algunos aspectos de la biología viral y de la interacción virus-célula infectada.

En los últimos años se han publicado varias técnicas que combinan la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ*³⁴⁵⁻³⁵¹. Las primeras que se describieron^{345,346} se basaban en la realización secuencial de un método inmunohistoquímico, que empleaba peroxidasa como enzima marcadora y diaminobencidina (DAB) como cromógeno, y de una hibridación *in situ* con sondas

marcadas radioactivamente. Después se sustituyeron las sondas radioactivas por sondas biotiniladas y se desarrollaron varios procedimientos con la finalidad de obtener dos reacciones coloreadas claramente distinguibles. En la tabla V.III se detallan las estrategias utilizadas por varios autores.

El desarrollo de estas técnicas supone solucionar varias cuestiones. En primer lugar hay que decidir el orden en que se realizan ambos métodos. Van der Loos y cols.³⁴⁸ y Graham y cols.³⁵¹ ensayaron varios protocolos en los que cambiaban el orden de realización de la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ*. Ambos concluyen que los mejores resultados se obtienen realizando primero la detección antigénica y a continuación la hibridación. Esto es lógico ya que la hibridación implica un calentamiento por encima de los 90°C para desnaturalizar la sonda y el ADN de la muestra, que puede causar una pérdida de antigenicidad en el tejido.

En segundo lugar hay que elegir dos sistemas de revelado que den lugar a dos colores que se puedan discriminar bien uno de otro y que tengan buen contraste respecto de la tinción de fondo. Además la reacción positiva de la inmunohistoquímica debe ser insoluble en alcohol y resistir temperaturas elevadas, pues durante la hibridación hay que deshidratar el tejido y, como ya se ha mencionado, calentar a más de 90°C.

La combinación que proponemos responde perfectamente a estos dos interrogantes: el oro coloidal amplificado con plata es insoluble en alcohol, resiste bien las temperaturas elevadas y su color negro se distingue perfectamente del color rojo del aminoetilcarbazol (AEC).

AUTOR	INMUNOHISTOQUIMICA		HIBRIDACION <i>IN SITU</i>	
	Detección	Revelado	Detección	Revelado
Mullink y cols. ³⁴⁷	Inmunoperoxidasa	H ₂ O ₂ /DAB ¹	Estreptavidina-biotina-fosfatasa alcalina	BCIP/NBT ²
Van der Loos y cols. ³⁴⁸	Inmunoperoxidasa	H ₂ O ₂ /DAB	Estreptavidina-biotina-fosfatasa alcalina	BCIP/NBT
Cubie y Norval ³⁴⁹	PAP ³	H ₂ O ₂ /DAB	Anti-biotina con oro coloidal	Amplificación con plata
Van den Brink y cols. ³⁵⁰	β -galactosidasa	Bromo-cloro-indol- β -D-galactopiranósido	Inmuno-oro	Amplificación con plata
Graham y cols. ³⁵¹	APAAP ⁴	BCIP/NBT	Estreptavidina-peroxidasa	H ₂ O ₂ /AEC ⁵

¹ Diaminobencidina.² Bromo-cloro-indol-fosfato / Azul de nitrotetrazolio.³ Peroxidasa-anti-peroxidasa.⁴ Fosfatasa alcalina-anti-fosfatasa alcalina.⁵ Amino-etil-carbazol.

Tabla V.III. Estrategias utilizadas por diversos autores para combinar inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en un mismo corte de tejido.

Esta técnica posibilitará la realización de nuevos estudios. Por un lado, permite cuantificar mediante análisis de imagen el porcentaje de células infectadas en las que se están transcribiendo los genes estructurales de HPV. Esto puede tener una gran importancia pronóstica. Como ya se ha señalado, normalmente la integración del genoma de HPV es un proceso lento, inducido por determinados cofactores, que puede producirse en cualquier momento durante la infección, incluso a partir de infecciones productivas. Por ello, el cálculo de este porcentaje puede tener gran interés, pues valores bajos pueden indicar precozmente el inicio de ese proceso de integración.

Por otro lado, a medida que se vayan desarrollando anticuerpos monoclonales específicos de proteínas reguladoras de los distintos tipos virales, esta técnica permitirá profundizar en los mecanismos de la infección y en la interacción virus-célula.

Finalmente, la técnica puede aplicarse también para detectar simultáneamente secuencias génicas específicas de HPV y proteínas celulares no víricas. De esta forma se puede estudiar la relación entre tipos virales y oncoproteínas, profundizando en los mecanismos de la carcinogénesis inducida por HPV.

V.8. CONSIDERACIONES GLOBALES.

A la vista de todo lo expuesto hasta ahora creemos que la hibridación *in situ* con sondas no radioactivas es la técnica de elección para el diagnóstico rutinario de la infección por HPV en biopsias ginecológicas, por varios motivos:

- Su sensibilidad en muestras con una cantidad suficiente de epitelio (más de 5 mm de longitud) es similar a la del Southern blot y sólo ligeramente inferior a la de la PCR.

- No requiere infraestructura o aparataje específico.
- Es rápida (la técnica utilizada por nosotros se realiza en una mañana) y prácticamente no requiere entrenamiento especial del personal que la realiza, sobre todo si se tiene experiencia en técnicas de inmunohistoquímica.
- No requiere destrucción del tejido, por lo que sus resultados se complementan con información histológica, importante en casos de infección múltiple y para estudiar características morfológicas de las reacciones positivas.

La PCR y el Southern blot pueden ser también de gran utilidad en algunos casos. El Southern blot permite conocer el estado físico del genoma de HPV en una lesión⁷²: integrado o episómico. La PCR²⁸⁷, por su mayor sensibilidad, se debería realizar en los casos en que se espere un número muy bajo de copias de HPV/célula, por ejemplo, en muestras negativas por hibridación *in situ* y para diagnosticar infecciones latentes en población de riesgo (mujeres jóvenes, sexualmente activas, sin pareja estable y que no utilizan métodos anticonceptivos de barrera), ya que, aunque varios autores^{324,325,352} han descrito técnicas de hibridación *in situ* con las que consiguen detectar una copia de HPV/célula, éstas no están todavía adaptadas al uso rutinario.

Ante cualquier sospecha de infección genital por HPV (lesión macroscópica, citología anormal, imagen colposcópica anómala) se debería tomar una biopsia para realizar estudio anatomopatológico convencional, inmunohistoquímica e hibridación *in situ* (detección y tipado) para HPV. De esta forma se le suministraría al clínico la siguiente información: clasificación de la lesión, confirmación o no de la presencia del genoma de HPV en la muestra y, en caso afirmativo, si la infección es productiva o no productiva y el tipo de HPV presente, o al menos el grupo de riesgo al que pertenece.

En este punto conviene hacer dos consideraciones:

1. Con respecto a la clasificación de la lesión creemos que, en piezas de cérvix, la modificación introducida por nosotros en el sistema de Bethesda puede ser de gran utilidad para el clínico, al separar una lesión claramente benigna (condiloma acuminado) del resto de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, que, aunque en su mayoría también son benignas, conviene considerarlas como lesiones con potencialidad de evolución maligna. No hay que olvidar que el sistema de Bethesda¹⁶⁶ surgió como un intento de unificar los criterios diagnósticos aplicados en citologías cérvico-vaginales y en este tipo de muestras no es posible distinguir un condiloma acuminado de un condiloma plano, por lo que ambos se engloban en la categoría LSIL. Sin embargo, histológicamente hay una clara diferencia entre ambas lesiones. De hecho, en la casi totalidad de los estudios que hemos realizado se han encontrado diferencias significativas entre los resultados obtenidos en condilomas acuminados y LSIL (inmunohistoquímica, HIS-detección, distribución de tipos virales, patrón de marcaje, patrón de distribución).
2. Con respecto a la técnica de HIS-tipado, el uso de sondas únicas específicas de los distintos tipos de HPV es de gran utilidad en estudios epidemiológicos, para estudiar la prevalencia de determinados tipos virales en los distintos medios geográficos, pero no es útil para el diagnóstico rutinario de la infección. En este caso es preferible el empleo de cócteles de sondas específicas de grupos de riesgo, puesto que aportan suficiente información y se disminuyen los costes al reducir el número de hibridaciones necesarias. Sin embargo, es necesario hacer una puntualización respecto de los tipos 31, 33 y 51 de HPV. Estos tipos virales se han considerado clásicamente de "riesgo intermedio"^{72,118,207,353} ya que se detectan en proporciones semejantes en todo tipo de lesiones (condilomas acuminados, SIL y carcinomas) En nuestra opinión, en lesiones con potencialidad de

evolución maligna, deben ser considerados de "alto riesgo" por varias razones:

- No hay diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos en biopsias cervicales positivas para los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV respecto de la inmunohistoquímica y el patrón de distribución de células positivas por hibridación *in situ*.
- El porcentaje de biopsias positivas para los tipos 31/33/51 en las que se observó un patrón de marcaje puntual es superior al obtenido en biopsias positivas para los tipos 16/18 (diferencia estadísticamente significativa).
- Los tipos 31/33/51 de HPV son los más frecuentes en carcinomas escamosos en nuestra serie.

Es posible que éste sea un grupo heterogéneo de virus en relación con el riesgo de carcinogénesis. En la bibliografía consultada los datos sobre estos tipos virales son contradictorios. Hellberg y cols.³⁵⁴, en un estudio de seguimiento a largo plazo, calcularon índices de progresión del 30% en lesiones positivas para HPV 31 (muy próximo al de lesiones positivas para HPV 6, 25%) y del 84.6% para lesiones positivas para HPV 33 (superior al de lesiones positivas para HPV 16, 52.9%). Kataja y cols.³⁵³, en un estudio similar, obtuvieron índices de progresión prácticamente iguales en lesiones positivas para HPV 31 (18.8%) y HPV 33 (19.4%) e inferiores al obtenido para biopsias positivas para HPV 16 (35.2%). Sería conveniente realizar estudios más amplios con sondas específicas de cada tipo viral para comprobar si estos tres tipos de HPV son realmente de "riesgo intermedio" o si alguno de ellos está mal clasificado y se puede considerar de riesgo bajo o alto. Hasta que estos estudios aporten mayor información, y a la vista de nuestros resultados, creemos que

es preferible considerarlos de "alto riesgo", opinión en la que coincidimos con Chang⁴⁸ y Paper y cols.³⁵⁵.

Después de estudiar la información recibida el clínico debe tomar una decisión terapéutica. El problema se plantea en muchas ocasiones en las lesiones de bajo grado, en las que los índices de progresión no son muy elevados. Hellberg y cols.³⁵⁴ señalan que sólo el 25% de los condilomas planos progresa, frente a un 73.9% de los CIN III; Weaver y cols.³⁵⁶ calculan unos índices de regresión, persistencia y progresión del 50%, 41% y 9% en CIN I, respectivamente, y del 43%, 48% y 9% en CIN II; Nasiell y cols.²¹¹ fijan estos índices en el 54%, 16% y 30%, respectivamente, en displasias moderadas. Un dato importante para sospechar que un SIL va a progresar es el tipo de HPV presente. La inmunohistoquímica, como ya se ha mencionado, también aporta una información valiosa, al distinguir entre infecciones productivas y no productivas. Pero en muchas ocasiones esto no es suficiente. Por ello varios investigadores han estudiado distintos parámetros como marcadores pronósticos:

Dudzinski y cols.³⁵⁷ y Kashyap y cols.³⁵⁸ consideran que la medida del DNA celular con microespectrofotometría puede ser de interés en este sentido, ya que el epitelio normal o reactivo es euploide, las lesiones hiperplásicas reversibles suelen ser poliploides y los carcinomas invasivos son típicamente aneuploides. Según Bitterman y Jenson¹¹⁸ la aneuploidía correlaciona bien con la presencia de mitosis atípicas en el tejido. Sin embargo, en la literatura se encuentran datos contradictorios. Por ejemplo, Multhaupt y cols.³⁵⁹, en un estudio de contenido de DNA por análisis de imagen en muestras citológicas, observaron poliploidía en el 51.7% de citologías normales, mientras que todos los casos de CIN (12) presentaban aneuploidía.

Tosi y cols.³⁶⁰ han estudiado parámetros morfométricos (área nuclear, perímetro, diámetro máximo, y factores de forma), número y tamaño de AgNOR y la expresión de diferentes citoqueratinas. Tan sólo el estudio de los AgNOR puede tener interés pronóstico, aunque sus resultados no son totalmente concluyentes.

Finalmente, Devictor y cols.³⁶¹ han estudiado recientemente la expresión de la proteína c-myc y del antígeno Ki-67 y Tervahauta y cols.³⁶², Holm y cols.³⁶³ y Bosari y cols.³⁶⁴ la expresión de la proteína p53. Sin embargo, los resultados no parecen indicar que estos marcadores sean de interés pronóstico.

Nosotros hemos estudiado tres características morfológicas de la hibridación *in situ* como posibles marcadores relacionados con la progresión de una lesión y los resultados obtenidos demuestran que el patrón de marcaje aporta una sólida información pronóstica, bien de forma aislada, bien conjuntamente con el patrón de distribución.

En resumen, creemos que el riesgo de progresión de una lesión intraepitelial escamosa viene determinado por el tipo de HPV detectado (6/11, bajo riesgo; 16/18 y 31/33/51, alto riesgo), el resultado de la técnica de inmunohistoquímica para HPV (resultado positivo, mejor pronóstico; resultado negativo, peor pronóstico) y el patrón de marcaje observado en la hibridación *in situ* (puntual y mixto, mayor riesgo de evolución; uniforme, menor riesgo de evolución). Probablemente, la ausencia de compatibilidad histopatológica con infección por HPV sea también un factor de riesgo de progresión.

Así pues, centrándonos en el riesgo de evolución a malignidad de las SIL, la peor combinación de factores de riesgo correspondería a una lesión positiva para los tipos 16/18 ó 31/33/51 de HPV, no compatible histopatológicamente con infección por HPV, negativa por inmunohistoquímica y con un patrón de marcaje puntual. La mejor combinación correspondería a una lesión positiva para los tipos 6/11 de HPV, compatible histopatológicamente con infección por HPV, positiva por inmunohistoquímica y con un patrón de marcaje uniforme.

En cualquier caso, siempre que se detecte un tipo de HPV de alto riesgo, independientemente del tipo de lesión (aunque sea un condiloma acuminado, positivo por inmunohistoquímica y con patrón de marcaje uniforme) y del tratamiento que se efectúe, habría que someter a la paciente a un programa de vigilancia y seguimiento con controles periódicos, a fin de detectar precozmente

el desarrollo de una nueva lesión en cualquier localización genital. Esto es debido a que, como han demostrado Kulski y cols.³⁶⁵ y Rymark y cols.³⁶⁶, la infección genital por HPV no debe considerarse como una infección puntual en el sitio de la lesión, sino como una infección multifocal o generalizada de todo el tracto genital inferior.

VI. CONCLUSIONES

A continuación se enumeran las conclusiones obtenidas en relación con los objetivos que nos fijamos al iniciar el estudio:

** Objetivo 1: Comprobar la utilidad de la inmunohistoquímica como técnica diagnóstica de la infección genital por HPV.*

- 1. La detección inmunohistoquímica del antígeno estructural común de HPV no es la técnica de elección para el diagnóstico rutinario de la infección genital por HPV, pero es de gran utilidad para confirmar el carácter productivo de una infección. Esta información es importante como factor pronóstico para predecir la evolución de una lesión.**

** Objetivo 2: Establecer el tamaño más adecuado de una biopsia genital para minimizar el número de falsos positivos por hibridación in situ.*

- 2. En biopsias diagnosticadas de condiloma acuminado, tanto de vulva como de cérvix uterino, la longitud del epitelio no influye de forma significativa en el resultado obtenido mediante hibridación *in situ*.**
- 3. En biopsias cervicales diagnosticadas de SIL la longitud de epitelio influye de forma significativa en el resultado obtenido mediante hibridación *in situ*. Las muestras con una longitud de epitelio inferior a 5 mm se deben considerar como material insuficiente para la realización de esta técnica.**

** Objetivo 3: Comprobar la utilidad de la hibridación in situ como técnica diagnóstica de la infección genital por HPV.*

- 4. La hibridación *in situ* con sondas no radioactivas es una técnica perfectamente válida para el diagnóstico rutinario de la infección genital por HPV y para realizar estudios retrospectivos sobre esta infección. Los mejores resultados se obtienen combinando técnicas de HIS-detección e HIS-tipado.**

5. La hibridación *in situ* debe realizarse en todas las biopsias diagnosticadas de SIL, independientemente de que sean histopatológicamente compatibles o no con infección por HPV.
 6. El empleo de cócteles de sondas específicas de grupos de riesgo de HPV respecto de la carcinogénesis en técnicas de HIS-tipado aporta una valiosa información en el estudio de esta infección y es idóneo para el diagnóstico rutinario.
- * *Objetivo 4: Estudiar la distribución de los grupos de HPV de bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo de carcinogénesis en lesiones genitales benignas, lesiones con potencialidad de evolución maligna y lesiones malignas.*
7. Los tipos 6/11 de HPV se asocian con condilomas acuminados, tanto en vulva como en cérvix uterino, mientras que los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV se asocian con lesiones intraepiteliales de alto grado y carcinomas escamosos. Los tipos 31/33/51 de HPV deben ser considerados de alto riesgo cuando se detectan en biopsias diagnosticadas de SIL.
 8. Hay una clara asociación entre los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV y las lesiones asociadas a HPV no compatibles histopatológicamente con infección por este virus.
 9. La distribución de los grupos virales estudiados no difiere significativamente en las distintas procedencias geográficas de las biopsias. Los tipos 31/33/51 de HPV son los que se han detectado con mayor frecuencia en el conjunto de muestras estudiadas.
- * *Objetivo 5: Realizar un estudio comparativo entre inmunohistoquímica e hibridación in situ.*

10. La hibridación *in situ* de ADN con sondas no radioactivas es más sensible que la inmunohistoquímica para diagnosticar la infección genital por HPV y aporta mayor información al permitir conocer el tipo de HPV presente en una muestra, o al menos el grupo de riesgo al que pertenece.
 11. Los tipos 16/18 y 31/33/51 de HPV producen preferentemente infecciones no productivas, mientras que los tipos 6/11 de HPV producen mayoritariamente infecciones productivas.
- * *Objetivo 6: Estudiar las características morfológicas de la hibridación in situ con fines pronósticos.*
12. El patrón de marcaje obtenido con hibridación *in situ* es un buen factor pronóstico para predecir la evolución de una lesión. Las biopsias diagnosticadas de SIL en las que se observa un patrón de marcaje puntual o mixto tienen mayor probabilidad de progresar a malignidad que aquéllas en las que se observa un patrón uniforme.
 13. El patrón de distribución obtenido con hibridación *in situ* y la distribución de células positivas en el grosor del epitelio no se pueden utilizar con fines pronósticos.
- * *Objetivo 7: Desarrollar nuevas técnicas que combinen inmunohistoquímica e hibridación in situ y que aporten mayor información al estudio de la infección genital por HPV.*
14. La técnica de doble marcaje desarrollada en este trabajo permite detectar simultáneamente antígenos víricos y secuencias génicas específicas de HPV, por lo que es de gran utilidad en el estudio de la interacción virus-célula.

CONCLUSION ADICIONAL

- 15. El condiloma acuminado de cérvix constituye una entidad diagnóstica distinta del resto de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, por lo que no debe ser incluido en esta categoría.**

VII. BIBLIOGRAFIA

1. zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977;78:1-30.
2. Gissmann L. Papillomaviruses and their association with cancer in animals and in man. *Cancer Surv* 1984;3:161-181.
3. Syrjänen K J. Papillomaviruses and cancer. En: Syrjänen K J, Gissmann L, Koss L G, eds. *Papillomaviruses and human diseases*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1987;468-503.
4. Quick C A, Watts S L, Krzyzek R A, Faras A J. Relationship between condylomata and laryngeal papillomata. *Ann Otol* 1980;89:467-471.
5. de Villiers E-M, Weidauer H, Otto H, zur Hausen H. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer* 1985;36:575-578.
6. Beckmann A M, Daling J R, Sherman K J, et al. Human papillomavirus and anal cancer. *Int J Cancer* 1989;43:1042-1049.
7. Winkler B W, Capo V, Reumann W, et al. Human papillomavirus infection of the esophagus: a clinocopathologic study with demonstration of papillomavirus antigen by the immunoperoxidase technique. *Cancer* 1985;55:149-155.
8. Moy R L, Eliezri Y D, Nuovo G J, Zitelli Z A, Bennett R G, Silverstein S J. Squamous cell carcinoma of the finger is associated with human papillomavirus type 16 DNA. *JAMA* 1989;261:2669-2673.
9. McDonnell J M, Mayr A J, Martin W J. DNA of human papillomavirus type 16 in dysplastic and malignant lesions of the conjunctiva and cornea. *N Engl J Med* 1989;320:1442-1446.
10. Orth G, Breitburd F, Favre M, et al. Papillomaviruses: possible role in human

cancer. En: Hiatt H H, Watson J D, Wisten J A, eds. *Origins of Human Cancer. Libro A: Incidence of Cancer in Humans*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1977;1043-1068.

11. Syrjänen K J. Human papillomavirus (HPV) lesions in association with cervical dysplasias and neoplasias. *Obstet Gynecol* 1983;62:617-622.

12. Syrjänen K J. Current concept on human papillomavirus (HPV) infections in the genital tract and their relationship to intraepithelial neoplasias and squamous cell carcinoma. *Obstet Gynecol Surv* 1984;39:252-265.

13. Syrjänen K J. Human papillomavirus (HPV) infection of the female genital tract and their associations with intraepithelial neoplasias and squamous cell carcinoma. *Pathol Annu* 1986;21:53-87.

14. Celso A C. *Los ocho libros de la medicina. Vol. II.* (Traducción directa del latín por Agustín Blazquez). Madrid, 1980.

15. Van-Svvieten. *Descripción compendiosa de las enfermedades que reynan lo mas comunmente en los exercitos, con el methodo de curarlas.* (Traducido al castellano por D. Agustín Argüello y Castrillo). Madrid: editorial de Andrés Ortega. 1767:152-166.

16. "Algunos doctores en cirugía y medicina". *Nuevos elementos de cirugía y medicina. Tomo I.* Madrid: establecimiento literario-tipográfico de P. Madoz y L. Sagasti. 1846:40-51.

17. Díaz Benito J, González y Velasco P. *Guía teórico-práctica del sangrador, dentista y callista, o tratado completo de cirugía menor o ministrante.* Madrid: imprenta de D. Alejandro Gómez Fuentesnebro. 1848:401-404.

18. Maestre-de San Juan A. *Tratado elemental de histología normal y patológica,*

precedido de un resumen de técnica de laboratorio. 2ª ed. Madrid. 1885:743-746.

19. Variot G. Un cas d'inoculation expérimentale des verrues de l'enfant à l'homme. *J Clin Therap Infant* 1894;2:529-531.

20. Ciuffo G. Innesto positivo conflittito di verruca vulgare. *G Ital Mal Vener* 1907;42:12-17.

21. Gross L. *Oncogenic viruses. 2ª ed. New York: Pergamon Press. 1970:49-81.*

22. Serra A. Studi sul virus della verruca, del papilloma, del condiloma acuminato. Etiologia, patogenesi, filtrabilità. *G Ital Mal Vener Pelle* 1924;65:1808-1814.

23. Shope R E, Hurst E W. Infectious papillomatosis of rabbits; with a note on the histopathology. *J Exp Med* 1933;58:607-624.

24. Rous P, Beard J W. A virus-induced mammalian growth with the characters of a tumor (The Shope rabbit papilloma).I. The growth on implantation within favorable hosts. *J Exp Med* 1934;60:701-722.

25. Rous P, Beard J W. A virus-induced mammalian growth with the characters of a tumor (The Shope rabbit papilloma).III. Further characters of the growth. General discussion. *J Exp Med* 1934;60:741-766.

26. Rous P, Beard J W. The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papilloma (Shope). *J Exp Med* 1935;62:523-548.

27. Ayer J E. The vaginal smear: "precancer" cell using a modified technique. *Am J Obstet Gynecol* 1949;58:1205-1219.

28. Koss L G, Durfee G R. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann N Y Acad*

Sci 1956;63:1245-1261.

29. Ayer J E. Role of the halo cell in cervical carcinogenesis. *Obstet Gynecol* 1960;15:481-491.

30. Naib Z N, Masukawa N. Identification of condyloma accuminata cells in routine vaginal smears. *Obstet Gynecol* 1961;18:735-738.

31. Rotkin L D. A comparison review of key epidemiological studies in cervical cancer related to current searches for transmissible agents. *Cancer res* 1973;33:1353-1367.

32. Richart R M. Cervical intraepithelial neoplasia. En: Sommers S C, ed. *Pathology Annual*. New York: Appleton-Century-Crofts, 1973;301-328.

33. Kessler I I. Human cervical cancer as a venereal disease. *Cancer Res* 1976;36:783-791.

34. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina I. Cytologic patterns. *Acta Cytol* 1976;20:505-509.

35. Purola E, Savia E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. *Acta Cytol* 1977;21:26-31.

36. zur Hausen H. Condylomata and human genital cancer. *Cancer Res* 1976;36:530.

37. Gissmann L, Pfister H, zur Hausen H. Human papillomaviruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology* 1977;76:569-580.

38. Orth G, Favre M, Croissant O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol* 1977;24:108-120.

39. Orth G, Jablonska L, Jarzabek-Chorzelska M, et al. Characterization of the lesions and risk of malignant conversion associated with the type of papillomavirus involved in epidermodisplasia verruciformis. *Cancer Res* 1979;39:1074-7082.
40. Gissmann L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condiloma acuminata). *Int J Cancer* 1980;25:605-609.
41. de Villiers E M, Gissman L, zur Hausen H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J Virol* 1981;40:932-935.
42. Reid R, Lavery C R, Coppelson M, et al. Noncondylomatous cervical wart virus infection. *Obstet Gynecol* 1979;55:476-483.
43. Jenson A B, Rosenthal J D, Olson C, et al. Immunologic relatedness of papillomaviruses from different species. *J Natl Cancer Inst* 1980;64:495-500.
44. Kurman R, Shah K V, Lancaster W D, et al. Immunoperoxidase localization of papillomavirus antigens in cervical dysplasias and vulvar condylomas. *Am J Obstet Gynecol* 1981;140:931-935.
45. Broker T R, Botchan M. Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. En: Botchan M, Grodzicker T, Sharp P A, eds. *Cancer cells 4: DNA tumor viruses*. Cold Spring Harbor, N Y: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986;17-35.
46. Ferenczy A, Braun L, Shah K V. Human papillomavirus (HPV) in condylomatous lesions of the cervix. A comparative ultrastructural and immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 1981;5:661-670.
47. de Villiers E-M. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 1989;63:4898-4903.

48. Chang F. Role of papillomaviruses. *J Clin Pathol* 1990;43:269-276.
49. Kaur P, McDougall J K. Transformation of mouse cells by human papillomavirus type-6b and type-18 DNAs. En: Steinberg B M, Brandsma J L, Taichman L B, eds. *Cancer cells, vol. 5*. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1987:249-252.
50. Kanda T, Watanabe S, Yoshiike K. Human papillomavirus type 16 transformation of rat 3Y1 cells. *Jpn J Cancer Res* 1987;78:103-108.
51. Laimins L A, Bedell M A, Jones K H, Long J A. Transformation of NIH-3T3 and primary rat embryo fibroblasts by human papillomavirus type 16 and 18. En: Steinberg B M, Brandsma J L, Taichman L B, eds. *Cancer cells, vol. 5*. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1987:201-207.
52. Morgan D, Pecoraro G, Rosenberg I, Defendi V. Transformation of C127 mouse fibroblasts by human papillomavirus 16. *Cancer Res* 1988;48:2505-2511.
53. Yasumoto S, Burkhardt A L, Doniger J, DiPaolo J A. Human papillomavirus type 16 DNA induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J Virol* 1986;57:572-577.
54. Watanabe S, Yoshiike K. Transformation of rat 3Y1 cells by human papillomavirus typ-18 DNA. *Int J Cancer* 1988;41:896-900.
55. Kaur P, McDougall J K. Characterization of primary human keratinocytes transformed by human papillomavirus type 18. *J Virol* 1988;62:1917-1924.
56. Pirisi L, Yasumoto S, Feller M, Doniger J, Di Paolo J A. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* 1987;61:1061-1066.

57. McCance D J, Kopan R, Fuchs E, Laimins L A. Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7169-7173.
58. Dyson N, Howley P M, Munger K, Harlow E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243:934-937.
59. Werness B A, Levine A J, Howley P M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248:76-79.
60. Pirisi L, Creek K E, Doniger J, et al. Continuous cell lines with altered growth and differentiation properties originate after transfection of human keratinocytes with human papillomavirus type-16 DNA. *Carcinogenesis* 1988;9:1573-1579.
61. Schlegel R, Phelps W C, Zhang Y-L, Barbosa M. Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. *EMBO J* 1988;7:3181-3187.
62. Lacey M, Alpert S, Hanahan D. Bovine papillomavirus genome elicits skin tumors in transgenic mice. *Nature* 1986;322:609-612.
63. Kreider J W, Howett M K, Wolfe S A, et al. Morphological transformation *in vivo* of human uterine cervix with papillomavirus from condylomata acuminata. *Nature* 1985;317:639-641.
64. Sexually transmitted disease: extract from the annual report of the Chief Medical Officer of the Department of Health and Social Security. *Genitourin Med* 1985;61:204-207.
65. Evans S, Dowling K. The changing prevalence of cervical human papilloma virus infection. *Aust New Zealand J Obstet Gynecol* 1990;30:375-377.

66. Becker T. Cervical papillomavirus infection and cervical dysplasia in hispanic, native american, and non-hispanic white woman in New Mexico. *J Public Health* 1991;81:582-586.
67. Matorras R, Ariceta J M, Alonso M. Epidemiología de la condilomatosis genital. *Clin Inv Gen Obstet* 1989;16:428-435.
68. Cancelo M J. *Infección genital femenina por papilomavirus. Valor de la exploración, citología, colposcopia e histología versus inmunohistoquímica e hibridación*. Tesis doctoral. Dpto. de Especialidades Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá de Henares. 1994.
69. Francki R I B, Fauquet C M, Krudson D L, Brown F. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on taxonomy of viruses. *Arch Virol* 1991;Supl. 2:146-149.
70. Melnick J L, Allison A C, Butel J S, et al. Papovaviridae. *Intervirology* 1974;3:106-120.
71. Coggin J R, zur Hausen H. Workshop on papillomaviruses and cancer. *Cancer Res* 1979;39:545-546.
72. Roman A, Fife K H. Human papillomaviruses: are we ready to type?. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:166-190.
73. Pfister H, Fuchs P G. Papillomaviruses: particles, genome organisation and proteins. En: Syrjänen K J, Gissman L, Koss L G, eds. *Papillomaviruses and human diseases*. Heidelberg: Springer-Verlag 1987:1-18.
74. Tomita Y, Shirasawa H, Sekine H, Simizu B. Expression of the human papillomavirus type 6b L2 open reading frame in Escherichia coli: L2-beta-galactosidase fusion proteins and their antigenic properties. *Virology* 1987;158:8-

14.

75. Giri I, Danos O. Papillomavirus genomes. From sequence data to biological properties. *Trends Genet* 1986;2:227-232.

76. Taichman L B, Reilly S S, LaPorta R F. The role of keratinocyte differentiation in the expression of epitheliotropic viruses. *J Invest Dermatol* 1983;81:137-140.

77. Chen E Y, Howley P M, Levinson A D, Seeburg A D. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* 1982;299:529.

78. Danos O, Engel L W, Yaniv M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J* 1982;1:231-236.

79. Schwartz E, Durst M, Demankowski C, et al. Sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. *EMBO J* 1983;12:2341-2348.

80. Seedorf K, Krammer G, Durst M, Suhai S, Rowenkamp W. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* 1985;145:181-184.

81. Danos O, Engel L W, Chen E Y, Yaniv M, Howley P M. A comparative analysis of the human type 1a and bovine type 1 papillomavirus genomes. *J Virol* 1983;46:557-566.

82. Lazo P A. Human papillomaviruses in oncogenesis. *Bioessays* 1988;9:162-168.

83. Schwartz E, Freese U K, Gissman L, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*

1985;314:111.

84. Spalholz B A, Wang Y-C, Howley P M. Transactivation of a bovine papillomavirus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell* 1985;42:183-191.

85. Androphy E J, Lowy D R, Schiller J T. Bovine papillomavirus E2 transactivating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature* 1987;325:70-73.

86. Phelps W C, Yee C L, Munger K, Howley P M. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 1988;53:539.

87. Smotkin D, Wettstein F O. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4680-4684.

88. Seedorf K, Oltersdorf T, Krammer G, Rowenkamp W. Identification of early proteins of the human papillomaviruses type 16 (HPV 16) and 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells. *EMBO J* 1987;6:139-144.

89. Schwartz E, Schneider-Gadicke A, zur Hausen H. Human papillomavirus type-18 transcription in cervical carcinoma cell lines and in human cell hybrids. En: Steinberg B M, Brandsma J L, Taichman L B, eds. *Cancer cells 5: papillomaviruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory 1987;47-53.

90. Schiller J T, Vass W C, Vousden K H, Lowy D R. E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. *J Virol* 1986;57:1-6.

91. DiMaio D, Guralski D, Schiller J T. Translation of open reading frame E5 of

bovine papillomavirus is required for its transforming activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:1797.

92. Halbert C L, Galloway D A. Identification of the E5 open reading frame of human papillomavirus type 16. *J Virol* 1988;62:1071-1075.

93. Shen S-L, Mounts P. Transforming activity of E5a protein of human papillomavirus type 6 in NIH 3T3 and C127 cells. *J Virol* 1990;64:3226-3233.

94. Pilacinsky W P, Glassman D L, Krzyzek, Sadowski P L, Robbins A K. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the bovine papillomavirus L1 and L2 open reading frames. *Biotechnology* 1984;2:356.

95. Campo M S, Spandidos D A, Lang J, Wilkie N M. Transcriptional control signals in the genome of bovine papillomavirus type 1. *Nature* 1981;303:77-80.

96. Crum C P, Nuovo G J. Biology of papillomaviruses. En: Crum C P y Nuovo G J, eds. *Genital papillomaviruses and related neoplasms*. New York: Raven Press, 1991:10-35.

97. Smotkin D, Berek J S, Fu Y S, Hacker N F, Major F G, Wettstein F O. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1986;68:241-244.

98. Tase T, Okagaki T, Clark B A, Twiggs L B, Ostrow R S, Faras A J. Human papillomavirus DNA in adenocarcinoma in situ, microinvasive adenocarcinoma of the uterine cervix and coexisting cervical squamous intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 1989;8:8-17.

99. Stoler M H, Walker A N, Mills S E. Small cell neuroendocrine carcinoma of the cervix: a human papillomavirus type 18 associated cervix cancer. *Lab Invest* 1989;60:92A.

100. Monsonégo J. Etude Virologique. En: Monsonégo J, ed. *Dysplasies du col utérin et papillomavirus humains*. Paris: Maloine, 1988:31-40
101. Oriel J D. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis* 1971;47:1-13.
102. Ferenczy A, Mitao M, Nagai N, Silverstein S J, Crum C P. Latent papillomavirus and recurring genital warts. *N Engl J Med* 1985;313:784-788.
103. Macnab J C M, Walkinshaw S A, Cordiner J W, Clemens J B. Human papillomavirus in clinically and histologically normal tissue of patients with genital cancer. *N Engl J Med* 1986;315:1052-1058.
104. Walkinshaw S A, Cordiner J W, Clements J B, MacNab J C M. Prognosis of women with human papillomavirus DNA in normal tissue distal to invasive cervical and vulvar cancer. *Lancet* 1987;i:563.
105. Cox M F, Meanwell C A, Maitland N J, Blackledge G, Scully C, Jordan J A. Human papillomavirus type-16 homologous DNA in normal human ectocervix. *Lancet* 1986;ii:157-158.
106. Toom P G, Arrand J R, Wilson L P, Sharp D S. Human papillomavirus infection of the uterine cervix of women without cytological signs of neoplasia. *Br Med J* 1986;293:1261-1264.
107. Burk R D, Kadish A S, Calderin S, Romney S L. Human papillomavirus infection of the cervix detected by cervicovaginal lavage and molecular hybridization: correlation with biopsy results and Papanicolaou smear. *Am J Obstet Gynecol* 1986;154:982-989.
108. Lorincz A T, Temple G F, Patterson J A, Bennett A B, Kurman R J, Lancaster W D. Correlation of cellular atypia and human papillomavirus deoxyribonucleic acid sequences in exfoliated cells of the uterine cervix. *Obstet*

Gynecol 1986;68:508-512.

109. de Villiers E-M, Wagner D, Schneider A, et al. Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. *Lancet* 1987;ii:703-706.

110. Fife K H, Rogers R E, Zwickl B W. Symptomatic and asymptomatic cervical infections with human papillomavirus during pregnancy. *J Infect Dis* 1987;156:904-911.

111. Schneider A, Hotz M, Gissmann L. Increased prevalence of human papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women. *Int J Cancer* 1987;40:198-201.

112. Wickenden C, Malcolm A D B, Byrne M A, Smith C, Anderson M C, Coleman D V. Prevalence of HPV DNA and viral copy numbers in cervical scrapes from women with normal and abnormal cervixes. *J Pathol* 1987;153:127-135.

113. Fuchs P G, Girardi F, Pfister H. Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int J Cancer* 1988;41:41-45.

114. Nuovo G J. Correlation of histology with human papillomavirus DNA detection in the female genital tract. *Gynecol Oncol* 1988;31:176-181.

115. Nuovo G J, Nuovo M A, Cottrill S, Gordon S, Silverstein S J, Crum C P. Histological correlates of clinically occult human papillomavirus infection of the uterine cervix. *Am J Surg Pathol* 1988;12:198-204.

116. Kiviat N B, Koutsky L A, Paavonen J A, et al. Prevalence of genital papillomavirus infection among women attending a college student health clinic or a sexually transmitted disease clinic. *J Infect Dis* 1989;159:293-302.

- 117.** Ferenczy A, Winkler B. Cervical intraepithelial neoplasia and condyloma. En: Kurman R J ed. *Blaustein's pathology of the female genital tract*. New York: Springer-Verlag, 1987:177-217.
- 118.** Bitterman P, Jenson A B. Uterine cervix. En: Henson D E, Albores-Saavedra J, eds. *Pathology of incipient neoplasia*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1993:248-267.
- 119.** Wilbur D C, Reichman R C, Stoler M H. Detection of infection by human papillomavirus in genital condylomata. A comparison study using immunocytochemistry and *in situ* nucleic acid hybridization. *Am J Clin Pathol* 1988;89:505-510.
- 120.** Alonso M J, Gómez F, Muñoz E, et al. Comparative study of *in situ* hybridization and immunohistochemical techniques for the detection of human papillomavirus in lesions of the uterine cervix. *Eur J Histochem* 1992;36:271-278.
- 121.** Doorbar J, Ely S, Sterling J, McClean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991;352:824-827.
- 122.** Cullen A P, Reid R, Campion M, Lorincz A T. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 1991;65:606-612.
- 123.** Gage J R, Meyers C, Wettstein F O. The E7 proteins of non-oncogenic human papillomavirus type 6B (HPV-6B) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol* 1990;64:723-730.
- 124.** Baker C C, Howley P M. Different promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissue. *EMBO J* 1987;6:1027-1035.

- 125.** Lazo P A. Structure, DNase I hypersensitivity and expression of integrated papillomavirus in the genome of HeLa cells. *Eur J Biochem* 1987;165:393-401.
- 126.** Schneider-Maunouroy S, Croissant O, Orth G. Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J Virol* 1987;61:3295-3298.
- 127.** Gissmann L, de Villiers E M, zur Hausen H. Analysis of human genital warts (condylomata acuminata) and other genital tumors for human papillomavirus type 6 DNA. *Int J Cancer* 1982;29:143-146.
- 128.** Stoler M H, Broker T R. In situ hybridization detection of human papillomavirus DNAs and messenger RNAs in genital condylomas and a cervical carcinoma. *Hum Pathol* 1986;17:1250-1258.
- 129.** Beckmann A M, Myerson D, Daling J R, Kiviat N B, Fenoglio C M, McDougall J K. Detection and localization of human papillomavirus DNA in human genital condylomas by in situ hybridization with biotinylated probes. *J Med Virol* 1985;16:265-273.
- 130.** Fu Y S, Braun L, Shah K V, Lawrence W D, Robboy S J. Histologic, nuclear DNA, and human papillomavirus studies of cervical condylomas. *Cancer* 1983;52:1705-1711.
- 131.** Guillet G, Braun L, Shah K V, Ferenczy A. Papillomavirus in cervical condylomas with and without associated cervical intraepithelial neoplasia. *J Invest Dermatol* 1983;81:513-516.
- 132.** Morin C, Braun L, Casas-Cordero M, et al. Confirmation of the papillomavirus etiology of condylomatous cervix lesions by the peroxidase-antiperoxidase technique. *J Natl Cancer Inst* 1981;66:831-835.

- 133.** Syrjanen K J, Pyrhonen S. Demonstration of human papilloma virus antigen in the codylomatous lesions of the uterine cervix by immunoperoxidase technique. *Gynecol Obstet Invest* 1982;14:90-96.
- 134.** Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:3812-3815.
- 135.** Kulski J K, Howard M J, Pixley E C. DNA sequences of human papillomavirus types 11, 16 or 18 in invasive cervical carcinoma of Western Australian women. *Immunol Cell Biol* 1987;65:7-84.
- 136.** McCance D J, Campion M J, Clarkson P K, Chesters P M, Jenkins D, Singer A. Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the cervix. *Br J Obstet Gynaecol* 1985;92:1101-1105.
- 137.** Sutton G P, Stehman F B, Ehrlich C E, Roman A. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid in lesions of the female genital tract: evidence for type 6/11 in squamous carcinoma of the vulva. *Obstet Gynecol* 1987;70:564-568.
- 138.** Beaudenon S, Kremsdorf D, Croissant O, Jablonska S, Wain-Hobson S, Orth G. A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* 1986;321:246-249.
- 139.** Lorincz A T, Quinn A P, Lancaster W D, Temple G F. A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* 1987;159:187-190.
- 140.** Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA and its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 1984;3:1151-1157.

- 141.** Fukushima M, Okagaki T, Twiggs L B, et al. Histological types of carcinoma of the uterine cervix and the detectability of human papillomavirus DNA. *Cancer Res* 1985;45:3252-3255.
- 142.** Gissmann L, Boshart M, Durst M, Ikenberg H, Wagner D, zur Hausen H. Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J Invest Dermatol* 1984;83:26S-28S.
- 143.** Grussendorf-Conen E I, Ikenberg H, Gissmann L. Demonstration of HPV-16 genomes in the nuclei of cervix carcinoma cells. *Dermatologica* 1985;170:199-201.
- 144.** Ostrow R S, Manias D A, Clark B A, Okagaki T, Twiggs L B, Faras A J. Detection of human papillomavirus DNA in invasive carcinomas of the cervix by in situ hybridization. *Cancer Res* 1987;47:649-653.
- 145.** Yoshikawa H, Matsukura T, Yamamoto E, Kwana T, Mizuno M, Yoshiike K. Occurrence of human papillomavirus types 16 and 18 DNA in cervical carcinomas from Japan: age of patients and histological type of carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1985;76:667-671.
- 146.** Lehn H, Krieg P, Sauer G. Papillomavirus genomes in human cervical tumors: analysis of their transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:5540-5544.
- 147.** Tsunokawa Y, Takebe N, Nozawa S, et al. Presence of human papillomavirus type-16 and type-18 DNA sequences and their expression in cervical cancers and cell lines from Japanese patients. *Int J Cancer* 1986;37:499-503.
- 148.** Zachow K R, Ostrow R S, Bender M, et al. Detection of human papillomavirus DNA in anogenital neoplasias. *Nature* 1982;300:771-773.

- 149.** Collins J E, Jenkins D, McCance D J. Detection of human papillomavirus DNA sequences by in situ DNA-DNA hybridization in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma: retrospective study. *J Clin Pathol* 1988;41:289-295.
- 150.** Crum C P, Ikenberg H, Richart R M, Gissmann L. Human papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. *N Engl J Med* 1984;310:880-883.
- 151.** Gupta J, Pilotti S, Rilke F, Shah K V. Association of human papillomavirus type 16 with neoplastic lesions of the vulva and other genital sites by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1987;127:206-215.
- 152.** Lorincz A T, Lancaster W D, Kurman R J, Jenson A B, Temple G F. Characterization of human papillomaviruses in cervical neoplasia and their detection in routine clinical screening. En: Peto R, zur Hausen H, eds. *Viral etiology of cervical cancer*. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986:225-238.
- 153.** McCance D J, Walker P G, Dyson J L, Coleman D V, Singer A. Presence of human papillomavirus DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia. *Br Med J* 1983;287:784-788.
- 154.** Schneider A, Kraus H, Schuhmann R, Gissmann L. Papillomavirus infection of the lower genital tract: detection of viral DNA in gynecological swabs. *Int J Cancer* 1985;35:443-448.
- 155.** Wagner D, Ikenberg H, Boehm N, Gissmann L. Identification of human papillomavirus in cervical swabs by deoxyribonucleic acid in situ hybridization. *Obstet Gynecol* 1984;64:767-772.
- 156.** Wickenden C, Steele A, Malcolm A D B, Coleman D V. Screening for wart virus infection in normal and abnormal cervixes by DNA hybridization of cervical

scrapes. *Lancet* 1985;i:65-67.

157. Sterrett G F, Alessandri L M, Pixley E, Kulski J K. Assessment of precancerous lesions of the uterine cervix for evidence of human papillomavirus infection: a histological and immunohistochemical study. *Pathology* 1987;19:84-90.

158. Webb D H, Rogers R E, Fife K H. A one-step method for detecting and typing human papillomavirus DNA in cervical scrape specimens from women with cervical dysplasia. *J Infect Dis* 1987;156:912-919.

159. Schneider A, Oltersdorf T, Schneider V, Gissmann L. Distribution pattern of human papilloma virus 16 genome in cervical neoplasia by molecular in situ hybridization of tissue sections. *Int J Cancer* 1987;39:717-721.

160. Nagai N, Nuovo G, Friedman D, Crum C P. Detection of papillomavirus nucleic acids in genital precancers with the in situ hybridization technique. *Int J Gynecol Pathol* 1987;6:366-379.

161. Crum C P, Braun L A, Shah K V, et al. Vulvar intraepithelial neoplasia: correlation of nuclear DNA content and the presence of a human papilloma virus (HPV) structural antigen. *Cancer* 1982;49:468-471.

162. Reagan J W, Seidemann I L, Saracusa Y. Cellular morphology of carcinoma *in situ* and dysplasia or atypical hyperplasia of uterine cervix cancer. *Cancer* 1953;6:224.

163. Poulson H E, Taylor C H, Sobin L H. Histological typing of female genital tract tumours. Ginebra: World Health Organization 1975.

164. Weid G L. Proceedings of the First International Congress of exfoliative cytology (editorial). Viena: Appleton-Century-Crofts 1962:297.

- 165.** Richart R M. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol* 1968;5:748-784.
- 166.** Workshop: The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis. *JAMA* 1989;262:931-934.
- 167.** Luff R D. The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis. Report of the 1991 Bethesda workshop. *Hum Pathol* 1992;23:719-721.
- 168.** Barron B A, Richart R M. A statistical model of the natural history of cervical carcinoma based on a prospective study of 557 cases. *J Natl Cancer Inst* 1968;41:1343-1350.
- 169.** Fu Y S, Reagan J W, Richart R M. Definitions of precursors. *Gynecol Oncol* 1981;12:220-231.
- 170.** Fu Y S, Reagan J W, Richart R M. Precursors of cervical cancer. *Cancer Surv* 1983;2:359-365.
- 171.** Tabbara S, Saleh A D M, Andersen W A, Barber S R, Taylor P T, Crum C P. The Bethesda classification for squamous intraepithelial lesions: histologic, cytologic and viral correlates. *Obstet Gynecol* 1992;79:338-346.
- 172.** Franquemont D W, Ward B E, Andersen W A, Crum C P. Prediction of "high risk" cervical papillomavirus infection by biopsy morphology. *Am J Clin Pathol* 1989;92:577-582.
- 173.** Crum C P, Mitao M, Levine R U, Silverstein S. Cervical papillomaviruses segregate within morphologically distinct precancerous lesions. *J Virol* 1984;54:675-681.
- 174.** Bibbo M, Dytch S B, Alenghat E, Bartels P H, Wied G L. DNA ploidy profiles

as prognostic indicators in CIN lesions. *Am J Clin Pathol* 1989;92:261.

175. Barron B A, Cahill M C, Richart R M. A statistical model of the natural history of cervical neoplastic disease: the duration of carcinoma *in situ*. *Gynecol Oncol* 1978;6:196-205.

176. McIndoe W, McLean J, Jones R, Mullins P. The invasive potential of carcinoma in situ of the cervix. *Obstet Gynecol* 1984;64:451-452.

177. Gustafsson L, Adami H-O. Natural history of cervical neoplasia: consistent results obtained by an identification technique. *Br J Cancer* 1989;60:132-141.

178. Ferenczy A, Winckler B. Carcinoma and metastatic tumors of the cervix. En: Kurman R J ed. *Blaustein's pathology of the female genital tract*. New York: Springer-Verlag, 1987: 218-256.

179. Kurman R J, Norris H J, Wilkinson E. Tumors of the cervix. En: Rosai J, Sobin L H eds. *Tumors of the cervix, vagina and vulva*. Bethesda: Armed Forces Institute of Pathology. 1992:37-139.

180. Japaze H, Van Dinh T, Woodruff J D. Verrucous carcinoma of the vulva: a study of 24 cases. *Obstet Gynecol* 1982;60:462-467.

181. Spratt D W, Lee S C. Verrucous carcinoma of the cervix. *Am J Obstet Gynecol* 1977;129:699-670.

182. Van Nagell J R, Donaldson E S, Wood E G, et al. Small cell cancer of the uterine cervix. *Cancer* 1977;40:2243-2249.

183. Hurt W G, Silverberg S G, Frable W F, et al. Adenocarcinoma of the cervix: histopathologic and clinical features. *Am J Obstet Gynecol* 1977;129:304-313.

- 184.** Barnes W, Delgado G, Kurman R J, et al. Possible prognostic significance of human papillomavirus type in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1988;29:267-273.
- 185.** Dekmezian R, Chen X, Kuo T, Ordonez N, Katz R. Dna hybridization for human papillomavirus (HPV) in cervical lesions. *Arch Pathol Lab Med* 1987;111:22-27.
- 186.** de Villiers E M, Schneider A, Gross G, zur Hausen H. Analysis of benign and malignant urogenital tumors for human papillomavirus infection by labelling cellular DNA. *Med Microbiol Immunol* 1986;174:281-286.
- 187.** Choo K B, Pan C C, Liu M S, et al. Presence of episomal and integrated human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinoma. *J Med Virol* 1987;21:101-107.
- 188.** Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnurch H G, zur Hausen H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:560-563.
- 189.** Kurman R J, Schiffman M H, Lancaster W D, et al. Analysis of individual human papillomavirus types in cervical neoplasia: a possible role for type 18 in rapid progression. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:293-296.
- 190.** Millan D W M, Davis J A, Torbet T E, Campo M S. DNA sequences of human papillomavirus types 11, 16 and 18 in lesions of the uterine cervix in the west of Scotland. *Br Med J* 1986;293:93-96.
- 191.** Pater M M, Dunne J, Hogan G, Chatage P, Pater A. Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in early cervical neoplasia. *Virology* 1986;155:13-18.
- 192.** Reeves W C, Caussy D, Brinton L A, et al. Case-control study of human

papillomaviruses and cervical cancer in Latin America. *Int J Cancer* 1987;40:450-454.

193. Syrjanen S, Syrjanen K, Mantyjarvi R, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA sequences demonstrated by in situ DNA hybridization in serial paraffin-embedded cervical biopsies. *Arch Gynecol* 1986;239:39-48.

194. Richart R M. Causes and management of cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 1987;60(Supl.):1951-1959.

195. Lorincz A T, Lancaster W D, Temple G F. Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J Virol* 1986;58:225-229.

196. Beaudenon S, Kremsdorf D, Obalek S, et al. Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology* 1987;161:374-384.

197. Naghashfar Z S, Rosenshein B N, Lorincz A T, Buscema J, Shah K V. Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18-related virus of the genital tract. *J Gen Virol* 1987;68:3073-3079.

198. Nuovo G J, Crum C P, de Villiers E M, Levine R U, Silverstein S J. Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J Virol* 1988;62:1452-1455.

199. Gómez F, Abad M M, Muñoz E, et al. Study of infection by human papillomavirus in severe dysplasias and carcinomas *in situ* of the uterine cervix using immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *Eur J Histochem* 1992;36:137-142.

200. Rando R F, Sedlacek T V, Hunt J, Jenson A B, Kurman R J, Lancaster W

D. Verrucous carcinoma of the vulva associated with an unusual type 6 human papillomavirus. *Obstet Gynecol* 1986;67(Supl.):70-75.

201. Rando R F, Groff D E, Chirikjian J G, Lancaster W D. Isolation and characterization of a novel human papillomavirus type 6 DNA from an invasive vulvar carcinoma. *J Virol* 1986;57:353-356.

202. Rando R F, Lancaster W D, Han P, López C. The noncoding region of HPV-6vc contains two distinct transcriptional enhancing elements. *Virology* 1986;155:545-546.

203. Kasher M S, Roman A. Characterization of human papillomavirus type 6b DNA isolated from an invasive squamous carcinoma of the vulva. *Virology* 1988;165:225-233.

204. Koutsky L A, Galloway D A, Holmes K K. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol Rev* 1988;10:122-163.

205. Wilczynski S P, Bergen S, Walker J, Lia S Y, Pearlman L F. Human papillomaviruses and cervical cancer: analysis of histopathologic features associated with different viral types. *Hum Pathol* 1988;19:697-704.

206. Tase T T, Okagaki T, Clark B A, et al. Human papillomavirus types and localization in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix: a study by in situ DNA hybridization. *Cancer Res* 1988;48:993-998.

207. Lorincz A T, Temple G F, Kurman R J, et al. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1987;79:671-677.

208. Richart R M. The correlation of Schiller-positive areas on the exposed portion of the cervix with intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1964;90:697-702.

- 209.** Staffl A, Mattingly R F. Colposcopic diagnosis of cervical neoplasia. *Obstet Gynecol* 1973;41:168-175.
- 210.** Guzick D S. Efficacy of screening for cervical cancer: a review. *Am J Public Health* 1978;68:125-130.
- 211.** Nasiell K, Nasiell M, Vaclavinkova V. Behavior of moderate cervical dysplasia during long term follow-up. *Obstet Gynecol* 1983;61:609-615.
- 212.** Boras V F, Duggan M A. Cervical dyskeratotic cells as predictors of condylomatous changes on biopsy. *Acta Cytol* 1989;33:223-227.
- 213.** Lundberg G D. Quality assurance in cervical cytology: the Papanicolaou smear. *JAMA* 1989;262:1672-1679.
- 214.** Gay J D, Donaldson L D, Goellner J R. False negative results in cervical cytological studies. *Acta Cytol* 1985;29:1043-1046.
- 215.** Della Torre G, Pilotti S, De Palo G, Rilke F. Viral particles in cervical condylomatous lesions. *Tumori* 1978;64:549-553.
- 216.** Grunebaum A N, Sedlis A, Sillman F, Fruchter R, Stanek A, Boyce J. Association of human papillomavirus infection with cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 1983;62:448-455.
- 217.** Hills E, Lavery C R. Electron microscopic detection of papillomavirus particles in selected koilocytotic cells in routine cervical smears. *Acta Cytol* 1979;23:53-56.
- 218.** Kadish A S, Burk R D, Kress Y, Calderin S, Romney S L. Human papillomaviruses of different types in precancerous lesions of the uterine cervix: histologic, immunocytochemical and ultrastructural studies. *Hum Pathol*

1986;17:384-392.

219. Morin C, Meisels A. Human papillomavirus infection of the uterine cervix. *Acta Cytol* 1980;24:82-84.

220. Pilotti S, Rilke F, Shah K V, Della Torre G, De Palo G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence of papillomavirus infection associated with in situ and microinvasive squamous cell carcinoma of the vulva. *Am J Surg Pathol* 1984;8:751-761.

221. Standbridge C M, Butler E B. Human papillomavirus infection of the lower female genital tract: association with multicentric neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 1983;2:264-274.

222. Standbridge C M, Mather J, Curry A, Butler E B. Demonstration of papillomavirus particles in cervical and vaginal scrape material: a report of 10 cases. *J Clin Pathol* 1981;34:524-531.

223. Syrjanen K, Vayrynen M, Mantyjarvi R, et al. Electron microscopy in assessment of the biological behavior of human papillomavirus infections in the uterine cervix. *Neoplasia* 1986;33:493-506.

224. Kienzler J L. Humoral immunity to human papillomaviruses. *Clin Dermatol* 1985;4:144-155.

225. Ogilvie M M. Basics in human wart immunology. En: Prunieris M, ed. *Biomedical aspects of human wart virus infection*. Lyon: Fondation Merieux, 1976;183-189.

226. Firzlaff J M, Hsia C-NL, Halbert C P H L, Jenison S A, Galloway D A. Polyclonal antibodies to human papillomavirus type 6b and type 16 bacterially derived fusion proteins. En: Steinberg B M, Brandsma J L, Taichman L B, eds.

Cancer cells 5: papillomaviruses. Cold Spring Harbor, N Y: Cold Spring Harbor Laboratory, 1987;105-113.

227. Jenison S A, Firzlaff J M, Langenberg A, Galloway D A. Identification of immunoreactive antigens of human papillomavirus type 6b using *Escherichia coli*-expressed fusion proteins. *J Virol* 1988;62:2115-2123.

228. Tomita Y, Hiroshi S, Sekine H, Simizu B. Expression of the human papillomavirus type 6b L2 open reading frame in *Escherichia coli*: L2- β -galactosidase fusion proteins and their antigenic properties. *Virology* 1987;158:8-14.

229. Jenison S A, Yu X P, Valentine J M, Galloway D A. Human antibodies react with an epitope of the human papillomavirus type 6b L1 open reading frame which is distinct from the type-common epitope. *J Virol* 1989;63:809-818.

230. Jenison S A, Yu X P, Valentine J M, et al. Evidence of prevalent genital-type human papillomavirus infections in adults and children. *J Infect Dis* 1990;162:60-69.

231. Jochmus-Kudielka I, Schneider A, Braun R, et al. Antibodies against the human papillomavirus type 16 early proteins in human sera: correlation of anti-E7 reactivity with cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1698-1704.

232. Crum C P, Barber S, Roche J K. Pathobiology of papillomavirus-related cervical diseases: prospects for immunodiagnosis. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:270-285.

233. Dillner J, Dillner L, Utter G, et al. Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the L1 and L2 open reading frames. *Int J Cancer* 1990;45:529-535.

- 234.** Dillner J. Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the E1, E2, E4, E5, E6 and E7 open reading frames. *Int J Cancer* 1990;46:703-711.
- 235.** Orth G, Breitburd F, Favre M. Evidence for antigenic determinants shared by the structural polypeptides of (Shope) rabbit papillomavirus and human papillomavirus tpe 1. *Virology* 1978;91:243-255.
- 236.** Hsu S-M, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-580.
- 237.** Alessandri L M, Sterrett G F, Pixley E C, Kulski J K. Comparison of peroxidase-antiperoxidase and avidin-biotin complex methods for the detection of papillomavirus in histological sections of the cervix uteri. *Pathology* 1986;18:382-385.
- 238.** Firzlaff J M, Kiviat N B, Beckmann A M, Jenison S A, Galloway D A. Detection of human papillomavirus capsid antigens in various squamous epithelial lesions using antibodies directed against the L1 and L2 open reading frames. *Virology* 1988;164:467-477.
- 239.** Li C H, Shah K V, Seth A, Gilden R V. Identification of the human papillomavirus type 6b L1 open reading frame protein in condylomas and corresponding antibodies in human sera. *J Virol* 1987;61:2684-2690.
- 240.** Kurman R J, Jenson A B, Lancaster W D. Papillomavirus infection of the cervix. II. Relationship to intraepithelial neoplasia based on the presence of specific viral structural proteins. *Am J Surg Pathol* 1983;7:39-52.
- 241.** Gupta J W, Gupta P K, Shah K V, Kelly D P. Distribution of human papillomavirus antigen in cervicovaginal smears and cervical tissues. *Int J Gynecol Pathol* 1983;2:160-170.

- 242.** Portolani M, Borgatti M A, Bartoletti A M, et al. Papillomavirus genus-antigens in vulvar and cervical condylomatous lesions. *Microbiologica* 1983;6:115-120.
- 243.** Woodruff J D, Braun L, Cavalieri R, Gupta P, Pass F, Shah K V. Immunologic identification of papillomavirus antigen in condyloma tissues from the female genital tract. *Obstet Gynecol* 1980;56:727-732.
- 244.** Sato S, Okagaki T, Clark B A, et al. Sensitivity of koilocytosis, immunochemistry, and electron microscopy as compared to DNA hybridization in detecting human papillomavirus in cervical and vaginal condyloma and intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 1987;5:297-307.
- 245.** Syrjanen K, Vayrynen M, Castren O, Mantylarvi R, Pyrhonen S, Yliskoski M. Morphological and immunohistochemical evidence of human papillomavirus (HPV) involvement in the dysplastic lesions of the uterine cervix. *Int J Gynecol Obstet* 1983;21:261-269.
- 246.** Syrjanen K J, Pyrhonen S. Immunoperoxidase demonstration of human papillomavirus (HPV) in dysplastic lesions of the uterine cervix. *Arch Gynecol* 1982;233:53-61.
- 247.** Toki T, Oikawa N, Tase T, Satoh S, Wada Y, Yajima A. Immunohistochemical demonstration of papillomavirus antigen in cervical dysplasia and vulvar condyloma. *Gynecol Obstet Invest* 1986;22:97-101.
- 248.** Breitburd F, Croissant O, Orth G. Expression of human papillomavirus type-1 E4 gene products in warts. En: Steinberg B M, Brandsmad J L, Taichman L B, eds. *Cancer cells 5: Papillomaviruses*. Cold Spring Harbor, N Y: Cold Spring Harbor Laboratory 1987;115-122.
- 249.** Doorbar J, Campbell D, Grand R J A, Gallimore P H. Identification of the

human papillomavirus-1a E4 gene products. *EMBO J* 1986;5:355-362.

250. Crum C P, Barber S R, Symbula M, Snyder K, Saleh A M, Roche J K. Co-expression of the human papillomavirus type 16 E4 and L1 open reading frames in early cervical neoplasia. *Virology* 1990;178:238-246.

251. Sekine H, Fuse A, Inaba N, Takamizawa H, Simizu B. Detection of the human papillomavirus 6b E2 gene product in genital condyloma and laryngeal papilloma tissues. *Virology* 1989;170:92-98.

252. Cason J, Patell D, Naylor J, et al. Identification of immunogenic regions of the major coat protein of human papillomavirus type 16 that contain type-restricted epitopes. *J Gen Virol* 1989;70:2973-2987.

253. Christensen N D, Kreider J W, Cladel N M, Galloway D A. Immunological cross-reactivity to laboratory-produced HPV-11 virions of polysera raised against bacterially derived fusion proteins and synthetic peptides of HPV-6b and HPV-16 capsid proteins. *Virology* 1990;175:1-9.

254. Rigby P W J, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 1977;113:237-251.

255. Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory Manual. Vol II.* New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

256. Law M-F, Lancaster W D, Howley P M. Conserved polynucleotide sequences among the genomes of papillomaviruses. *J Virol* 1979;32:199-207.

257. Willet G D, Kurman R J, Reid R, Greenberg M, Jenson A B, Lorincz A T. Correlation of the histological appearance of intraepithelial neoplasia of the cervix with human papillomavirus types. *Int J Gynecol Pathol* 1989;8:18-25.

- 258.** Broker T R, Chow L T. Human papillomaviruses of the genital mucosa: electron microscopic analyses of DNA heteroduplexes formed with HPV types 6, 11, and 18. En: Botchan M, Grodzicker T, Sharp P A, eds. *Cancer cells 4: DNA tumor viruses*. Cold Spring Harbor, N Y: Cold Spring Harbor Laboratory 1986;589-594.
- 259.** Southern E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-517.
- 260.** Maitland N J, Cox M F, Lynas C, Prime S S, Meanwell C A, Scully C. Detection of human papillomavirus DNA in biopsies of human oral tissue. *Br J Cancer* 1987;56:245-250.
- 261.** Dubeau L, Chandler L A, Gralow J R, Nichols P W, Jones P A. Southern blot analysis of DNA extracted from formalin fixed pathology specimens. *Cancer Res* 1986;46:2964-2970.
- 262.** Goelz S E, Hamilton S R, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde-fixed and paraffin-embedded tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;130:118-124.
- 263.** Mark A, Trowell H, Dyall-Smith M L, Dyall-Smith D J. Extraction of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded pathology specimens and its use in hybridization (histo-blot) assays. Application to the detection of human papillomavirus DNA. *Nucleic Acids Res* 1987;56:501-507.
- 264.** Nuovo G J, Silverstein S J. Comparison of formalin, buffered formalin, and Bouin's fixation on the detection of human papillomavirus DNA from genital lesions. *Lab Invest* 1988;59:720-724.
- 265.** Nuovo G J, Richart R M. A comparison of slot blot, Southern blot and in situ hybridization analyses for human papillomavirus DNA in genital tract lesions.

Obstet Gynecol 1989;74:673-677.

266. Moench T R, Gendelman H E, Clements J E, Narayan O, Griffin D E. Efficiency of in situ hybridization as a function of probe size and fixation technique. *J Virol Methods* 1985;11:119-130.

267. Nuovo G J, Richart R M. Buffered formalin is the superior fixative for the detection of human papillomavirus DNA by in situ hybridization analysis. *Am J Pathol* 1989;134:837-842.

268. Syrjanen S, Syrjanen K. An improved in situ DNA hybridization protocol for detection of human papillomavirus (HPV) DNA sequences in paraffin-embedded biopsies. *J Virol Methods* 1986;14:293-304.

269. Maples J. A method for the covalent attachment of cells to glass slides for use in immunohistochemical assays. *Am J Clin Pathol* 1985;83:356-363.

270. Denhardt D T. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1966;23:641-647.

271. Wahl G M, Stern M, Stark G R. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:3683-3688.

272. Renz M, Kurz C. A colorimetric method for DNA hybridization. *Nucleic Acids Res* 1984;12:3435.

273. Amasino R M. Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol. *Anal Biochem* 1986;152:304-309.

274. Syrjanen S, Partanen P, Mantyjarvi R, Syrjanen K. Sensitivity of in situ hybridization techniques using biotin- and ³⁵S-labeled human papillomavirus

(HPV) DNA probes. *J Virol Methods* 1988;19:225-238.

275. Nuovo G J, Richart R M. A comparison of Biotin- and ³⁵S-based *in situ* hybridization methodologies for detection of human papillomavirus DNA. *Lab Invest* 1989;61:471-476.

276. Crum C P, Nagai N, Levine R U, Silverstein S. In situ hybridization analysis of HPV 16 DNA sequences in early cervical neoplasia. *Am J Pathol* 1986;123:174-182.

277. Gupta J W, Gupta P K, Rosenshein N, Shah K V. Detection of human papillomavirus in cervical smears: a comparison of in situ hybridization, immunocytochemistry and cytopathology. *Acta Cytol* 1987;31:387-396.

278. Neumann R, Heiles B, Zippel C, et al. Use of biotinylated DNA probes in screening cells obtained from cervical swabs for human papillomavirus DNA sequences. *Acta Cytol* 1986;30:603-607.

279. Caussy D, Orr W, Daya A D, Roth P, Reeves W, Rawls W. Evaluation of methods for detecting human papillomavirus deoxyribonucleotide sequences in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1988;26:236-243.

280. Cornelissen M T E, van der Velden K J, Walboomers J M M, et al. Evaluation of different DNA-DNA hybridisation techniques in detection of HPV 16 DNA in cervical smears and biopsies. *J Med Virol* 1988;25:105-114.

281. Melchers W J G, Herbrink P, Walboomers J M M, et al. Optimization of human papillomavirus genotype detection in cervical scrapes by a modified filter in situ hybridization test. *J Clin Microbiol* 1989;27:106-110.

282. Parkkinen S. Nucleic acid sandwich hybridization in detection of HPV 16 DNA: technique and its clinical application. *J Virol Methods* 1988;19:69-77.

- 283.** Parkkinen S, Mantyjarvi R, Syrjanen K, Ranki M. Detection of human papillomavirus DNA by the nucleic acid sandwich hybridization method from cervical scraping. *J Med Virol* 1986;20:279-288.
- 284.** Mullis K B, Faloona F A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-350.
- 285.** Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.
- 286.** Shibata D K, Arnheim N, Martin W J. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1988;167:225-230.
- 287.** Melchers W J G, Claas H C J, Quint W G V. Use of the polymerase chain reaction to study the relationship between human papillomavirus infections and cervical cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:714-727.
- 288.** Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;339:237-238.
- 289.** Kitchin P A, Szotyori Z, Fromhole C, Almond N. Avoidance of false positives. *Nature* 1990;244:201.
- 290.** Beyer-Finkler E, Pfister H, Girardi F. Anti-contamination primers to improve specificity of polymerase chain reaction in human papillomavirus screening. *Lancet* 1990;ii:1289-1290.
- 291.** Pao C C, Lin C Y, Maa J S, Lai C H, Wu S Y, Soong Y K. Detection of human papillomaviruses in cervicovaginal cells using polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1990;161:113-115.

- 292.** Anceschi M M, Falcinelli C, Pieretti M, Cosmi E V. Multiple primer pairs PCR for the detection of HPV types. *J Virol Methods* 1990;28:59-66.
- 293.** Claas E C J, Melchers W, van de Linden J, Lindeman J, Quint W. Human papillomavirus detection in paraffin embedded cervical carcinomas and metastases of the carcinomas by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1989;135:703-709.
- 294.** Melchers W J G, van den Brule A J C, Walboomers J M M, et al. Increased detection rate of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction as compared to modified FISH and Southern blot analysis. *J Med Virol* 1989;27:329-335.
- 295.** Van den Brule A J C, Meijer C J L M, Bakels V, Kenemans P, Walboomers J M M. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990;28:2739-2743.
- 296.** Van den Brule A J C, Claas E C J, du Maine M, et al. Use of anticontamination primers in the polymerase chain reaction for the detection of human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and biopsies. *J Med Virol* 1989;29:20-27.
- 297.** Van den Brule A J C, Snijders P J F, Gordijn R L J, Bleker O P, Meijer C J L M, Walboomers J M M. General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas. *Int J Cancer* 1990;45:644-649.
- 298.** Tidy J A, Mason P, Farrell P J. A new and sensitive method for screening for human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol* 1989;74:410-414.
- 299.** Young L S, Bevan I S, Johnson M A, et al. The polymerase chain reaction:

a new epidemiological tool for investigating cervical human papillomavirus infection. *Br Med J* 1989;298:14-18.

300. Nuovo G J. Human papillomavirus DNA in genital tract lesions histologically negative for condylomata. Analysis by in situ, southern blot hybridization and the polymerase chain reaction. *Am J Surg Pathol* 1990;14:643-651.

301. Resnick R M, Cornelissen M T E, Wright D K, et al. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Nat Cancer Inst* 1990;82:1477-1484.

302. Burmer G C, Parker J D, Bates J, East K, Kulander B G. Comparative analysis of human papillomavirus detection by polymerase chain reaction and Virapap/Viratyp kits. *Am J Clin Pathol* 1990;94:554-559.

303. Kiyabu M T, Shibata D, Arnheim N, Martin W J, Fitzgibbons P L. Detection of human papillomavirus in formalin-fixed, invasive squamous carcinomas using the polymerase chain reaction. *Am J Surg Pathol* 1989;13:221-224.

304. Yliskoski M, Tervahauta A, Saarikoski S, Mantyjarvi R, Syrjanen K. Clinical course of cervical human papillomavirus lesions in relation to coexistent cervical infections. *Sex Transm Dis* 1992;19:137-139.

305. Barton S E, Hollingworth A, Maddox P H, et al. Possible cofactors in the etiology of cervical intraepithelial neoplasia. An immunopathologic study. *J Reprod Med* 1989;34:613-616.

306. Hildesheim A, Reeves W C, Brinton L A, et al. Association of oral contraceptive use and human papillomaviruses in invasive cervical cancers. *Int J Cancer* 1990;45:860-864.

307. Mougin C, Schaal J P, Bassignot A, et al. Detection of human papillomavirus

and human cytomegalovirus in cervical lesions by in situ hybridization using biotinylated probes. *Biomed Pharmacother* 1991;45:353-357.

308. Burger M P, Hollema H, Gouw A S, Pieters W J, Quint W G. Cigarette smoking and human papillomavirus in patients with reported cervical cytological abnormality. *BMJ* 1993;306:749-752.

309. Yee C I, Krishnan-Hewlett I, Baker C C, Schlegel R, Howley P M. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 1985;119:361-366.

310. Baker C C, Phelps W C, Lindgren V, Braun M J, Gonda M A, Howley P M. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1987;61:962-971.

311. Mincheva A, Gissman L, Zur Hausen H. Chromosomal integration sites of human papillomavirus DNA in three cervical cancer cell lines mapped by the in situ hybridisation. *Med Microbiol Immunol* 1987;176:245-256.

312. Brigati D J, Budgeon L R, Unger E R, et al. Immunocytochemistry is automated development of a robotic workstation based upon the capillary action principle. *J Histotechnol* 1988;11:165-183.

313. Brandsma J, Burk R D, Lancaster W D, Pfister H, Schiffman M H. Interlaboratory variation as an explanation for varying prevalence estimates of human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 1989;43:260-262.

314. Pao C C, Lai C H, Wu S Y, Young K C, Chang P L, Soong Y K. Detection of human papillomaviruses in exfoliated cervicovaginal cells by in situ DNA Hybridization Analysis. *J Clin Microbiol* 1989;27:168-173.

315. Beckmann A M, Sherman K J, Myerson D, Daling J R, McDougall J K,

Galloway D A. Comparative virologic studies of condylomata acuminata reveal a lack of dual infections with human papillomaviruses. *J Infect Dis* 1991;163:393-396.

316. Schadendorf D, Tiedemann K H, Haas N, Czarnetzki B M. Detection of human papillomaviruses in paraffin-embedded condylomata acuminata. Comparison of immunohistochemistry, in situ hybridization, and polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 1991;97:549-554.

317. Bejui-Thivolet F, Liagre N, Patricot L M, Chardonnet Y, Chignol M C. Human papillomavirus DNA in cervix. In situ hybridization with biotinylated probes on Bouin's fixed paraffin embedded specimens. *Pathol Res Pract* 1992;188:67-73.

318. Jou P, Palacín A, Puig-Tintoré L M, et al. Infección por papilomavirus humano en el tracto genital femenino. Estudio inmunohistoquímico. *Clin Invest Ginecol Obstet* 1989;16:181-187.

319. Ochotorena M M. *Lesiones genitales por papilomavirus humanos. Estudio inmunohistoquímico, de hibridación in situ y ultraestructural.* Tesis doctoral. Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia. 1993.

320. Hara Y, Tuchida S, Nakamura T, et al. Human papillomavirus infection of the uterine cervix analyzed by nonisotopic in situ hybridization. *J Med Virol* 1990;31:120-128.

321. Guérin-Reverchon I, Chardonnet Y, Chignol M C, Thivolet J. A comparison of methods for the detection of human papillomavirus DNA by in situ hybridization with biotinylated probes on human carcinoma cell lines. *J Immunol Methods* 1989;123:167-176.

322. Herrington C S, Burns J, Graham A K, Evans M, McGee J O'D. Interphase cytogenetics using biotin and digoxigenin labelled probes I: relative sensitivity of

both reporter molecules for detection of HPV 16 in CaSki cells. *J Clin Pathol* 1989;42:592-600.

323. Bleiweiss I J, Heller D, Dottino P, Cass I, Deligdisch L. Identifying human papillomavirus subtypes in cervical biopsies with in situ DNA hybridization with biotinylated probes. *J Reprod Med* 1992;37:151-156.

324. Unger E R, Hammer M L, Chenggis M L. Comparison of ³⁵S and biotin as labels for in situ hybridization: use of and HPV model system. *J Histochem Cytochem* 1991;39:145-150.

325. Herrington C S, de Angelis M, Evans M F, Troncone G, McGee J O'D. Detection of high risk human papillomavirus in routine cervical smears: strategy for screening. *J Clin Pathol* 1992;45:385-390.

326. Konno R, Sato S, Yajima A. Progression of squamous cell carcinoma of the uterine cervix from cervical intraepithelial neoplasia infected with human papillomavirus: a retrospective follow-up study by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Int J Gynecol Pathol* 1992;11:105-112.

327. Thompson C H, Rose B R. Deleterious effects of formalin/acetic acid/alcohol (FAA) fixation on the detection of HPV DNA by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Pathology* 1991;23:327-330.

328. Faulkner-Jones B E, Bellomario V M, Borg A J, Orzeszko K, Garland S M. Detection and typing of human papillomavirus using the Vira Type "in situ" kit: comparison with a conventional dot blot technique. *J Clin Pathol* 1990;43:913-917.

329. Cooper K, Herrington C S, Graham A K, Evans M F, McGee J O'D. In situ human papillomavirus (HPV) genotyping of cervical intraepithelial neoplasia in South African and British patients: evidence for putative HPV integration in vivo. *J Clin Pathol* 1991;44:400-405.

- 330.** Cooper K, Herrington C S, Graham A K, Evans M F, McGee J O'D. In situ evidence for HPV 16, 18, 33 integration in cervical squamous cell cancer in Britain and South Africa. *J Clin Pathol* 1991;44:406-409.
- 331.** Nuovo G J, Darfler M M, Impraim C C, Bromley S E. Occurrence of multiple types of human papillomavirus in genital tract lesions. *Am J Pathol* 1991;13:53-58.
- 332.** Meyer M P, Carbonell R I, Mauser N A, Kanbour A I, Amortegui A J. Detection of human papillomavirus in cervical swab samples by ViraPap and in cervical biopsy specimens by in situ hybridization. *Am J Clin Pathol* 1993;100:12-17.
- 333.** Thomassen L V, Warshaw J, Lawhead R A Jr, Unger E R. Invasive cervical cancer in young women. Clinicopathologic correlation and demonstration of human papillomavirus by in situ hybridization. *J Reprod Med* 1992;37:901-906.
- 334.** Aznar J, Ojeda A, Torres M J, Palomares J C, Rodríguez-Pichardo A. Dual genitotropic human papillomavirus infections in genital warts. *Genitourin Med* 1993;69:60-62.
- 335.** Riera J R, Junco P, Sampedro A, et al. Caracterización de tipos de papiloma virus humanos en displasias leves con cambios condilomatosos por hibridación in situ. *Patología* 1990;23:171-175.
- 336.** Domínguez F, Riera J R, Junco P, et al. Detección y tipificación del virus del papiloma humano en biopsias de cuello uterino. Un estudio de correlación con variables clínicas y morfológicas. *Clin Invest Ginecol Obstet* 1992;19:102-108.
- 337.** Herrington C S, Anderson S M, Graham A K, McGee J O. The discrimination of high-risk HPV types by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Histochem J* 1993;25:191-198.

- 338.** Reid R, Greenberg M, Jenson B, et al. Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am J Obstet Gynecol* 1987;156:212-222.
- 339.** Gitsch G, Reinthaller A, Tatra G, Breiteneker G. Diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection: punch biopsy versus cervical smear. *Arch Gynecol Obstet* 1991;249:179-184.
- 340.** Cooper K, Herrington C S, Stickland J E, Evans M F, McGee J O'D. Episomal and integrated human papillomavirus in cervical neoplasia shown by non-isotopic in situ hybridisation. *J Clin Pathol* 1991;44:990-996.
- 341.** Pöllänen R, Vuopala S, Lehto V P. Detection of human papillomavirus infection by non-isotopic in situ hybridisation in condylomatous and CIN lesions. *J Clin Pathol* 1993;46:936-939.
- 342.** Toki T, Yajima A. "HPV score". A scoring system for histological diagnosis of human papillomavirus infection in dysplasia of the uterine cervix. *Acta Pathol Jpn* 1987;449-455.
- 343.** Riou G, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Le Doussal V, Orth G. Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. *Lancet* 1990;335:1171-1174.
- 344.** Iwasaka T, Yokoyama M, Oh-uchida M, et al. Detection of human papillomavirus genome and analysis of expression of c-myc and Ha-ras oncogenes in invasive cervical carcinomas. *Gynecol Oncol* 1992;46:298-303.
- 345.** Brahic M, Haase A T, Cash E. Simultaneous in situ detection of viral RNA and antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:5445-5448.
- 346.** Haase A T. Analysis of viral infections by in situ hybridization. *J Histochem*

Cytochem 1986;34:27-32.

347. Mullink H, Walboomers J M, Tadema T M, Jansen D J, Meijer C J. Combined immuno- and non-radioactive hybridocytochemistry on cells and tissue sections: influence of fixation, enzyme pre-treatment, and choice of chromogen on detection of antigen and DNA sequences. *J Histochem Cytochem* 1989;37:603-609.

348. Van der Loos C, Volkers H, Rook R, van den Berg F, Houthoff H J. Simultaneous application of DNA in situ hybridization and immunohistochemistry on one tissue section. *Histochemical J* 1989;21:279-284.

349. Cubie H A, Norval M. Detection of human papilloma viruses in paraffin wax sections with biotinylated synthetic oligonucleotide probes and immunogold staining. *J Clin Pathol* 1989;42:988-991.

350. Van den Brink W, van der Loos C, Volkers H, et al. Combined β -galactosidase and immunogold/silver staining for immunohistochemistry and DNA in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1990;38:325-329.

351. Graham A K, Herrington C S, McGee J O'D. Simultaneous in situ genotyping and phenotyping of human papillomavirus cervical lesions: comparative sensitivity and specificity. *J Clin Pathol* 1991;44:96-101.

352. Heiles H B, Genersch E, Kessler C, Neumann R, Eggers H J. In situ hybridization with digoxigenin-labeled DNA of human papillomaviruses (HPV 16/18) in HeLa and SiHa cells. *Biotechniques* 1988;6:978-981.

353. Kataja V, Syrjanen K, Syrjanen S, et al. Prospective follow-up of genital HPV infections: survival analysis of the HPV typing data. *Eur J Epidemiol* 1990;6:9-14.

354. Hellberg D, Nilsson S, Grad A, et al. Behavior of cervical intraepithelial

neoplasia (CIN) associated with various human papillomavirus (HPV) types. *Arch Gynecol Obstet* 1993;252:119-128.

355. Paper T, Friedman M, Nur I. Use of sulfonated primers to detect and type papillomavirus in cell cultures and cervical biopsies. *Gene* 1991;103:155-161.

356. Weaver M G, Abdul-Karim F W, Dale G, Sorensen K, Huang Y T. Outcome in mild and moderate cervical dysplasias related to the presence of specific human papillomavirus types. *Mod Pathol* 1990;3:679-683.

357. Dudzinski M R, Haskill S J, Fowler W C, et al. DNA content in cervical neoplasia and its relationship to prognosis. *Obstet Gynecol* 1987;69:373-377.

358. Kashyap V, Das D K, Luthra U K. Microphotometric DNA analysis in moderate dysplasia of the uterine cervix. Correlation to the progression and regression of the lesion. *Acta Oncol* 1990;29:755-759.

359. Mulhaupt H, Bruder E, Elit L, Rothblat I, Warhol M. Combined analysis of cervical smears. Cytopathology, image cytometry and in situ hybridization. *Acta Cytol* 1993;37:373-378.

360. Tosi P, Luzi P, Santopietro R, et al. Morphometric assessment of the biological potential of human papillomavirus infections in the uterine cervix. *Appl Pathol* 1988;6:247-257.

361. Devictor B, Bonnier P, Piana L, et al. C-myc protein and Ki-67 antigen immunodetection in patients with uterine cervix neoplasia: correlation of microcytophotometric analysis and histological data. *Gynecol Oncol* 1993;49:284-290.

362. Tervahauta A I, Syrjänen S M, Vayrynen M, Saastamoinen J, Syrjänen K J. Expression of p53 protein related to the presence of human papillomavirus (HPV)

DNA in genital carcinomas and precancer lesions. *Anticancer Res* 1993;13:1107-1111.

363. Holm R, Skomedal H, Helland A, Kristensen G, Borresen A L, Nesland J M. Immunohistochemical analysis of p53 protein overexpression in normal, premalignant and malignant tissues of the cervix uteri. *J Pathol* 1993;169:21-26.

364. Bosari S, Roncalli M, Viale G, Boss P, Coggi G. p53 immunoreactivity in inflammatory and neoplastic diseases of the uterine cervix. *J Pathol* 1993;169:425-430.

365. Kulski J K, Demeter T, Rakoczy P, Sterrett G F, Pixley E C. Human papillomavirus coinfections of the vulva and uterine cervix. *J Med Virol* 1989;27:244-251.

366. Rymak P, Forslund O, Hansson B G, Lindholm K. Genital HPV infection not a local but a regional infection: experience from a female teenage group. *Genitourin Med* 1993;69:18-22.